



**Der Einfluss von Trichomen und kutikulären Lipiden auf die
bakterielle Besiedelung von *Arabidopsis thaliana*-Blättern**

**The influence of trichomes and cuticular lipids on *Arabidopsis
thaliana* leaf-associated bacterial communities**

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

Vorgelegt von

Eva Reisberg

aus

Würzburg

Würzburg, 2013

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller

1. Betreuer: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

2. Betreuer: Prof. Dr. Markus Riederer

3. Betreuer: Prof. Dr. Gwyn Beattie (Iowa State University, USA)

4. Betreuer: PD Dr. Susanne Berger

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der Einfluss von Trichomen und kutikulären Lipiden auf die bakterielle Besiedelung von *Arabidopsis thaliana*-Blättern“ 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, 7. 10. 2013

Eva Reisberg

Die Definition von Wahnsinn ist,
immer wieder das Gleiche zu tun und
andere Ergebnisse zu erwarten.

Albert Einstein

<u>Inhalt</u>	
1. Zusammenfassung	8
1.1 Zusammenfassung	8
1.2 Summary	10
2. Einleitung	12
2.1 Die Phyllosphäre als Lebensraum für Mikroorganismen	12
2.2 Einflüsse aus der Umwelt	14
2.3 Einflüsse der pflanzlichen Oberfläche	16
2.4 Zielsetzung der Arbeit	20
3. Methoden	21
3.1 Erläuterungen zu Vorgehensweise und Methoden	21
3.2 Pflanzenanzucht	24
3.3 Analyse kutikulärer Wachse	26
3.4 Mikroskopie von Blattoberflächen	27
3.5 Analyse phyllosphärenassoziierter bakterieller Gemeinschaften	28
3.5.1 Isolierung von Bakterien	28
3.5.2 Kultivierung von Bakterien	29
3.5.3 Quantifizierung von Bakterien	30
3.5.4 Gewinnung von 16S SSU rRNA-Gensequenzen	31
3.5.5 Klonierung	32
3.5.6 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)	34
3.5.7 Erstellung eines phylogenetischen Baums	37
3.5.8 Amplicon-Pyrosequenzierung	37
4. Ergebnisse	42
4.1 Charakterisierung kutikulärer Wachse	42
4.1.1 Wachse von <i>A. thaliana</i> Col-0 und <i>gl1</i> -Pflanzen	42
4.1.2 Wachse von <i>A. thaliana</i> Ler und <i>cer</i> -Mutanten	44
4.1.3 Elektronenmikroskopische Betrachtungen	52
4.2 Diversität kultivierbarer Isolate	55
4.2.1 Bakterien auf <i>A. thaliana</i> Col-0	55
4.2.2 Bakterien auf <i>A. thaliana</i> Ler nach Freilandperiode	59
4.2.3 Anreicherungskultivierung mit Hexadecan und Docosan	60
4.2.4 Mikroskopische Betrachtungen	62
4.3 Einfluss von Trichomen auf die bakterielle Besiedelung	65
4.3.1 Gesamtzellquantifizierung	65
4.3.2 DGGE-Analyse von klimaschrankangezogenen Pflanzen	66
4.3.3 DGGE-Analyse nach Freilandwachstumsperiode	70
4.3.4 Phylogenetische Einordnung	71
4.4 Einfluss von kutikulärer Wachszusammensetzung auf die bakterielle Besiedelung	75
4.4.1 Quantifizierung von Bakterien	75
4.4.2 Stabilität der Besiedelung des Wildtyps	77

4.4.3 DGGE-Vergleich der Phyllosphärengemeinschaften	79
4.4.4 Amplicon-Pyrosequenzierung der Phyllosphärengemeinschaften	86
5. Diskussion	99
5.1 Diversität, Stabilität und Quantität der bakteriellen Besiedelung von <i>A. thaliana</i> Blattoberflächen	99
5.2 Einfluss von Trichomen	102
5.3 Einfluss der kutikulären Wachse	108
5.4 Zentrale Aussagen	117
5.5 Ausblick	118
6. Literaturverzeichnis	120
7. Anhang	133
7.1 Abkürzungsverzeichnis	133
7.2 Organismen, Chemikalien, Materialien, Geräte, Kits, Standardprotokolle	135
7.3 Lösungen und Medien	141
7.4 Primersequenzen	144
7.5 T-Tests zur Wachsanalyse der <i>cer</i> -Mutanten (Abb. 13/14/15)	145
7.6 T-Tests zur Gesamtzellquantifizierung (Abschnitt 4.4.1, Abb. 32)	147
7.7 Zusätzliche DGGE-Gelbilder	148
8. Danksagung	153

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die oberirdischen Oberflächen von Pflanzen sind von komplexen mikrobiellen Konsortien besiedelt deren Zusammensetzung von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Zum einen spielen der geographische Standort und Witterungsbedingungen eine wichtige Rolle. Außerdem wird aber immer wieder die Pflanzenart als bestimmend für die Zusammensetzung der epiphytischen mikrobiellen Konsortien beschrieben. Allein die pflanzliche Oberfläche kann eine Vielzahl von Charakteristika aufweisen, die sich auf eine bakterielle Besiedelung auswirken könnten. Da verschiedene Pflanzenarten immer eine Kombination solcher Charakteristika besitzen, ließ sich bisher kein klarer Zusammenhang zwischen einzelnen Faktoren und ihrer Wirkung auf die bakterielle Besiedelung aufklären.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden zwei Eigenschaften pflanzlicher Oberflächen auf mögliche Auswirkungen auf ihre bakterielle Besiedelung hin untersucht. Dazu wurden Wildtyplinien und Mutanten von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Durch die Verwendung von Pflanzen gleichen genetischen Hintergrunds, die nur in den gewünschten Eigenschaften verändert waren, war eine Untersuchung dieser Eigenschaften weitgehend isoliert von anderen pflanzlichen Faktoren möglich.

Zunächst wurde die bakterielle Besiedelung von *A. thaliana* Wildtyplinien in kultivierungsbasierten Experimenten untersucht. Es wurde hierbei ein Überblick über die kultivierbare Diversität auf Pflanzen, die unter kontrollierten Bedingungen im Klimaschrank gewachsen waren und Pflanzen, die einen Freilandaufenthalt durchlaufen hatten, gewonnen. Dabei wurde eine Sammlung von etwa 140 bakteriellen Isolaten erstellt, die für zukünftige Inokulationsexperimente zur Verfügung stehen.

Der Einfluss von nicht-drüsigen Trichomen von *A. thaliana* auf die Quantität und Diversität der bakteriellen Besiedelung wurde am *A. thaliana* Col-0-Wildtyp mit normaler Behaarung und der trichomlosen *g/1*-Mutante untersucht. Mithilfe von DAPI-Färbungen und nachfolgender Zellzählung wurden die bakteriellen Gemeinschaften der beiden Pflanzenlinien quantifiziert. Dabei zeigten sich keine pflanzenlinienspezifischen Unterschiede. Durch die Amplifizierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene der Gemeinschaft und den nachfolgenden Einsatz der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) wurde ein Überblick über die Diversität der vorherrschenden Bakteriengruppen gewonnen. Obwohl Trichome als bevorzugte Siedlungsplätze von Bakterien gelten, wurden hier auch hinsichtlich der Diversität der bakteriellen Gemeinschaften keine Unterschiede zwischen den untersuchten Pflanzenlinien gefunden. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach Identifizierung und phylogenetischer Einordnung der in den DGGE-Profilen auftretenden Amplifikatbanden. Die Trichome von *A. thaliana* scheinen also unter den untersuchten Bedingungen keinen Einfluss auf die Differenzierung der bakteriellen Gemeinschaften auszuüben.

Als weiteres artspezifisches Merkmal von Pflanzenoberflächen wurde die Zusammensetzung der kutikulären Wachse als Einflussfaktor untersucht. Dafür wurden vier *eceriferum*-Mutanten (*cer*) von *A. thaliana* in Landsberg *erecta* (Ler) Wildtyp-Hintergrund eingesetzt, die sich hinsichtlich der kutikulären Wachszusammensetzung ihrer Blätter unterschieden. Um genügend Blattmasse zu erreichen wurden die Pflanzen unter kontrollierten Klimabedingungen angezogen und anschließend einer Freilandperiode ausgesetzt, um eine naturnahe Kolonisierung der Blätter zu erlauben. Die kutikuläre Wachszusammensetzung der ausgewählten Mutanten wurde analysiert und spezifische

Unterschiede in der Zusammensetzung der Blattwachse der vier Mutanten und des Wildtyps bestätigt. Die Quantifizierung der mikrobiellen Konsortien auf den Blättern der fünf Pflanzenlinien ergab keine pflanzenlinien-spezifischen Unterschiede.

Zur Untersuchung der Diversität der bakteriellen Besiedelung wurde zunächst ein DGGE-Screening durchgeführt. Hier zeigten sich deutliche pflanzenlinienspezifische Unterschiede, die vor allem die Gemeinschaften der *cer9*- und der *cer16*-Mutante betrafen. Zur genaueren Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien wurde die Amplicon-Pyrosequenzierung eingesetzt. Hierbei stellte sich die bakterielle Diversität auf allen Pflanzenlinien entsprechend des Phyllosphärenhabitats moderat divers und ungleich verteilt dar. Die Identifizierung der sequenzierten Phylotypen ließ eine bakterielle Kerngemeinschaft erkennen, die offensichtlich unbeeinflusst von der Wachszusammensetzung der Oberfläche auf allen Pflanzenlinien zu finden war. In Übereinstimmung mit Literaturdaten zu *A. thaliana* Phyllosphärenbakterien wurden hier unter anderem Sphingomonadales, Rhizobiales, *Pseudomonas* und *Methylobacterium* nachgewiesen. Weiterhin wurden 35 Phylotypen identifiziert, die differenziell auf einzelnen Pflanzenlinien auftraten. Hier handelte es sich um den pflanzenlinienspezifischen Teil der bakteriellen Gemeinschaften. Die statistische Analyse zeigte deutlich divergente Muster für die analysierten Bakteriengemeinschaften der fünf Pflanzenlinien. Vor allem die Gemeinschaften der *cer6*-, *cer9*- und *cer16*-Linie konnten in einer UniFrac-basierten Clusteranalyse von den anderen Pflanzenlinien abgegrenzt werden.

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die Mutationen in der Wachsbiosynthese zu divergenten bakteriellen Gemeinschaften führten. Als mögliche Wirkmechanismen kommen z.B. veränderte Wasserbenetzbarkeit oder Permeabilität der Kutikula der Mutantenlinien in Frage. In Kultivierungsversuchen wurden im Zuge dieser Arbeit zudem Hinweise auf eine Verwendung einzelner Wachskomponenten als Nahrungsquelle für einige spezialisierte Bakterien gewonnen. Durch reduzierte Gehalte solcher Komponenten in den Wachsen könnten also bestimmte Bakterienspezies im Wachstum gehindert werden. Allerdings konnten aufgrund der Komplexität der Wachszusammensetzung und deren Veränderungen keine Einzelkomponenten betreffenden Schlussfolgerungen gezogen werden. Dennoch wurden hier zum ersten Mal Ergebnisse erarbeitet, die aufzeigen, dass die Wachszusammensetzung der pflanzlichen Oberfläche als Selektionsfaktor für natürlich einwandernde bakterielle Besiedler von Bedeutung ist.

1.2 Summary

The above-ground parts of plants are colonized by diverse microbial consortia. Their composition is determined by several different factors. It has been shown that geographic location as well as weather conditions play an important role in shaping phyllosphere communities. Furthermore different plant species were described to harbor phylogenetically distinct epiphytic microbiota. The surfaces of plants can have multiple characteristics that might act on epiphytic bacteria. Different plant species, however, always exhibit a combination of distinct features that might influence the microbial habitat. Thus no clear-cut correlation between single plant features and their effect on bacteria could be elucidated yet.

Therefore, in the present study, two common features of plant surfaces and their potential effects on phyllosphere bacteria were investigated. Wildtype lines and several mutants of *Arabidopsis thaliana* were chosen for these investigations. By using plants in the same genetic background, being only mutated in single genes, the investigations could be conducted mostly isolated from additional though potentially influencing plant derived factors.

Initially the bacterial communities on *A. thaliana* were investigated by a cultivation based approach. First insights into the culturable bacterial diversity on plants, that were grown under controlled climatic conditions or had experienced an outdoor growth period, could be provided. The experiments yielded a collection of around 140 bacterial isolates, that can be used for future inoculation studies.

The influence of non-glandular trichomes of *A. thaliana* leaf surfaces on the quantity and diversity of associated bacterial communities was studied. The *A. thaliana* Col-0 wildtype which has trichomes on its leaves and the trichomeless *gl1*-mutant were used for the experiments. For quantification of the bacterial communities DAPI-staining and counting of total cells was applied. No plant line-specific differences were observed. To gain an overview on the diversity of the microbiota of the two plant lines, 16S rRNA-gene-based Denaturing Gradientgelectrophoreses (DGGE) was used. Trichomes have been described to be preferred colonization sites for bacteria. However, in these experiments no differences in the diversity of the bacterial communities on the two plant lines were observed. This result was confirmed even after sequencing of DGGE-bands and subsequent phylogenetic analysis. Therefore one can conclude that the trichomes of *A. thaliana* had no effect on the differentiation of leaf-associated communities under the conditions tested.

Moreover the potential effect of plant cuticular wax composition on phyllosphere bacterial communities was studied. Consequently, four *eceriferum* (*cer*) wax mutants with distinct alterations in cuticular wax composition and the *A. thaliana* Landsberg *erecta* wildtype were selected. These plant lines were grown in controlled climate conditions to ensure enough leaf biomass and subsequently subjected to an outdoor growth period to allow for a close to natural colonization by bacteria. The cuticular wax composition of the five plant lines was analysed and the wax phenotypical differences were confirmed. Total cell counts for quantification of the associated bacterial communities showed no significant differences between the bacterial communities of the five plant lines.

For diversity analysis of the communities an initial DGGE-screening was conducted. The community profiles and subsequent statistical analyses showed distinct patterns for the five plant lines, especially for the *cer9* and the *cer16* mutant. For a more detailed community analysis, a next

generation amplicon pyrosequencing approach was conducted. Upon application of this methodology the communities on all five plant lines were shown to be moderately diverse and uneven, typical for phyllosphere habitats. Identification of community members showed a bacterial core community shared by all plant lines. These bacteria were apparently not influenced by the surface wax composition. The phlotypes were identified as e.g. bacteria of the Sphingomonadales, Rhizobiales, *Pseudomonas* and *Methylobacterium* – which are commonly found in the *A. thaliana* phyllosphere. However, a considerable plant line-specific community was detected, consisting of 35 phlotypes which were differentially present on certain plant lines. Statistical analyses of the sequenced bacterial communities showed distinct patterns for the five plant lines. Specifically, the *cer6*, *cer9* and *cer16*-mutant communities formed distinct clusters in a UniFrac-based analysis.

The results showed that the mutations affecting the wax biosynthesis of the investigated plant lines led to divergent associated bacterial communities. The cuticular wax composition as plant species specific trait could affect bacteria through e.g. altered surface wettability or nutrient diffusion across the cuticle. Furthermore, in cultivation-based experiments of the present study, several bacteria were isolated that were able to grow on certain single wax compounds. Such bacteria could be affected by an altered cuticular wax composition. This however remains speculative, as due to the complexity of cuticular wax compositions, conclusions about the effects of single compounds could not be drawn. Taken together, the study presents results that hint towards wax composition acting as an important selection factor even for naturally colonizing bacterial communities.

2. Einleitung

2.1 Die Phyllosphäre als Lebensraum für Mikroorganismen

Alle oberirdischen Teile von Gefäßpflanzen werden als „Phyllosphäre“ bezeichnet (Lindow & Brandl 2003). Sie umfasst sowohl innenliegende Gewebe als auch die Oberfläche der Pflanzen, die mit geschätzten $1,2 \times 10^9 \text{ km}^2$ eine der größten biologischen Oberflächen der Erde darstellt (Riederer & Schreiber 1995). Diese Oberfläche ist, trotz ihrer wasser- und schmutzabweisenden Eigenschaften, nicht steril (Abb. 1). Sie stellt einen Lebensraum für mikrobielle Besiedler dar, die zum Teil sogar humanpathogenen Charakter haben (Teplitski et al. 2011, Rastogi et al. 2013). Auf den meisten Pflanzen und Gemüseprodukten leben jedoch komplexe mikrobielle Konsortien, die in der Regel weder den Pflanzen noch deren Konsumenten schaden (Vorholt 2012, Leff & Fierer 2013, Whipps et al. 2008).

Der Lebensraum Pflanzenoberfläche wird allgemein als heterogen, nährstoffarm und umweltexponiert beschrieben (Lindow & Brandl 2003, Vorholt 2012). So ist die pflanzliche Oberfläche nicht gleichmäßig glatt sondern weist Wellen und Täler an den Zellgrenzen der Epidermiszellen auf (Mechaber et al. 1996). Zusätzlich finden sich auf der Oberfläche Stomata und vielfach pflanzliche Trichome. Diese strukturellen Gegebenheiten werden offenbar auch von unterschiedlichem Nahrungs-, Wasser- und/oder Schutzangebot für bakterielle Zellen begleitet. Auf mikroskopischen Aufnahmen finden sich Bakterienansammlungen vor allem in den Vertiefungen an Zellgrenzen, um Stomata herum oder am Fuß von Trichomen (Monier & Lindow 2004, Baldotto & Olivares 2008, Barak et al. 2011). Es wurde außerdem gezeigt, dass das Nahrungsangebot für Bakterien nicht auf der ganzen Blattoberfläche gleich ist, sondern Orte, wie der Fuß von Trichomen, mit höherem Nährstoffangebot existieren (Remus-Emsermann & Leveau 2010, Remus-Emsermann et al. 2011).



Abb. 1: Blattabdrücke von Pfeffer und Passionsblume auf Nährböden.

Bakterien sind auf der Pflanzenoberfläche vielen Umwelteinflüssen ausgesetzt. So werden Pflanzenblätter und ihre Besiedler von UV-Strahlung durch Sonnenlicht getroffen, was zu DNA-Schädigungen führen kann (Sundin & Jacobs 1999). Außerdem sind sie dadurch, sowie durch Wind der Gefahr der Austrocknung ausgesetzt (Beattie 2011). Auch ein Zuviel an Wasser, wie bei einem

Regenguss, kann Bakterien von den Blättern waschen (Hirano & Upperr 2000). Weiterhin können Bakterien auf Pflanzenoberflächen auch konstitutiven pflanzlichen Abwehrmechanismen, wie antimikrobiellen Sekundärmetaboliten ausgesetzt sein (Wink 2003, Junker et al. 2011). Trotz dieser Einflüsse sind auf allen Pflanzen in der Natur beachtliche Populationen unterschiedlichster bakterieller Phylotypen zu finden (Vorholt 2012, Lambais et al. 2006, Yang et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass sich mikrobielle Populationsdichten auf Blättern und Nadeln von Bäumen zwischen 10^4 - 10^5 Zellen pro Quadratcentimeter Blattfläche belaufen (Redford et al. 2010). Dennoch weisen die meisten Pflanzen an Naturstandorten keine Krankheitssymptome auf, wie sie von pathogenen Bakterien herrühren können. Die bakteriellen Populationen dieser Pflanzen scheinen also größtenteils kommensaler oder symbiotischer Natur zu sein.

Bakterien kommen auf unterschiedlichen Wegen in die pflanzliche Phyllosphäre. Sie können durch Wind eingetragen werden oder durch Regen aus der Luft auf die Blätter transportiert werden (Upperr & Hirano 2002, Vokou et al. 2012). Auch wird vermutet, dass der Boden eine wichtige Inokulationsquelle darstellt (Bulgarelli et al. 2013). Zum einen könnten die Bodenbakterien durch Staub abgelagert werden oder auch durch Spritzwasser bei stärkeren Regengüssen aufgesprüht werden. Auch scheinen einige Bakterienspezies von den Wurzeln auf die Blätter von Pflanzen wandern zu können (Chi et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit der Einwanderung stellen Depositionen von Bakterien durch Insekten dar (Upperr & Hirano 2002) und es gibt Hinweise auf eine vertikale Weitergabe von Bakterien von der Mutterpflanze auf die Samen (Truyens et al. 2013). Die genauen Wege der natürlichen Einwanderung von Bakterien sowie deren Anteil an der späteren Gemeinschaft sind bislang noch nicht hinreichend erforscht.

Die Bakterien der Phyllosphäre müssen Strategien entwickelt haben, die ihnen ein Überleben und die Vermehrung in diesem Habitat sichern. Dabei gibt es epiphytische Besiedler, die die Bedingungen auf der Oberfläche ertragen und andere, die nach einer epiphytischen Phase geschützte Orte im Pflanzeninneren anstreben (Yu et al. 2013, Bodenhausen et al. 2013). In einer Proteomanalyse wurden Proteine gefunden, die mit der Stressantwort von Bakterien zusammenhängen (Delmotte et al. 2009). Vor allem für die Gattung *Pseudomonas* wurden Proteine gefunden die auf Motilität der Bakterien hinweisen. Eine transkriptombasierte Studie zeigte ebenfalls, dass *Pseudomonas* in der epiphytischen Phase vor allem solche Gene exprimieren, die der aktiven Fortbewegung, der Chemoperzeption und der Chemotaxis dienen, was ihnen ein schnelles Erreichen des Pflanzeninneren ermöglichen kann (Yu et al. 2013).

Häufige epiphytische Besiedler sind z.B. *Methylobacterium*-Stämme. Von ihnen ist bekannt, dass sie Pigmente zum Schutz vor UV-Licht synthetisieren können (Kutschera 2007, Holland & Polacco 1994, Sundin & Jacobs 1999). Zudem sind sie, durch Nutzung von Methanol als Kohlenstoffquelle, an ein Leben auf Pflanzen angepasst, die Methanol als Stoffwechselprodukt aus der Zellwandsynthese nach außen abgeben (Fall & Benson 1996). Es wurde bereits auf Proteomebene gezeigt, dass vor allem *Methylobacterium*-Stämme in der Phyllosphäre Proteine synthetisieren die mit der Methanolaufnahme in Verbindung stehen (Delmotte et al. 2009). Gattungen wie z.B. *Sphingomonas* synthetisierten verschiedenste Kohlenhydrat-Aufnahmesysteme. Bestimmte Bakterien scheinen in der Lage zu sein, Indol-3-Essigsäure auf die Pflanzenoberfläche abzugeben (Brandl & Lindow 1998). Dieses lockert die Zellwand auf und soll somit die Diffusion von gelösten Zuckern und Aminosäuren für die Bakterien aus dem Pflanzeninneren erleichtern. Außerdem wurden Phyllosphären-Bakterien beschrieben, die bestimmte polyzyklische aromatische Verbindungen oder Phenole abbauen können (Yutthammo et al. 2010, Sandhu et al. 2009). Die Verwendung solcher aus der Luft abgelagerten

Umweltchemikalien als Nahrung, könnte eine weitere Nische für spezialisierte Bakterien darstellen. Andere Bakterien scheinen das Sonnenlicht als Energiequelle zu nutzen, worauf die kürzlich gemachte Entdeckung mikrobieller Rhodopsine auf Pflanzenoberflächen hindeutet (Atamna-Ismael et al. 2012). Auch die Fixierung von Luftstickstoff, vor allem durch diverse Cyanobakteriengemeinschaften, wurde beschrieben (Fürnkranz et al. 2008, Rigonato et al. 2012). Der Schutz vor periodischer Austrocknung auf der hydrophoben Pflanzenoberfläche erfordert weitere Anpassungen (Beattie 2011). Allerdings sind auch hier Strategien bekannt, durch die Bakterien solche Phasen überleben können. So wurde die Produktion von oberflächenaktiven Substanzen berichtet, die die Anheftung der Bakterien erleichtern oder sie vor Austrocknung schützen können (Burch et al. 2011, Schreiber et al. 2005). Auch die Bildung von Aggregaten und Biofilmen mit extrazellulären Polymermatrices wurde beschrieben und könnte einen wichtigen Überlebensmechanismus angepasster Bakterien darstellen (Morris et al. 2002, Rigano et al. 2007).

2.2 Einflussfaktoren aus der Umwelt

Mikrobielle Konsortien auf Pflanzenoberflächen sind phylogenetisch komplex und von Pflanze zu Pflanze verschieden (Vorholt 2012). Daher stellt sich die Frage, wodurch die Zusammensetzung der Gemeinschaften bestimmt wird. Es ist bekannt, dass z.B. räumliche Faktoren eine Rolle spielen. So wurden auf *Tamarix*-Bäumen und Salatpflanzen, die jeweils an unterschiedlichen Orten gewachsen waren, divergente bakterielle Gemeinschaften gefunden (Qvit-Raz et al. 2012, Rastogi et al. 2012, Finkel et al. 2011). Ebenso wurden ortsspezifische Faktoren als wichtige Determinanten von *Methylobacterium*-Gemeinschaften auf Arabidopsis und Schneckenklee beschrieben (Knief et al. 2010a). Eine weitere Studie arbeitete einen Einfluss der Entfernung heraus, in der sich Pflanzen innerhalb des gleichen Habitats befanden. Dieser betraf jedoch nur einen Teil der bakteriellen Gemeinschaft (Finkel et al. 2012). Hier scheint also die Verbreitungsfähigkeit bestimmter Spezies eine Rolle zu spielen.

Als weiterer wichtiger Faktor, der die bakterielle Zusammensetzung der Phyllosphärengemeinschaften prägen kann, wurde die Jahreszeit der Probenahme ermittelt. Auf Pappelblättern, die im Jahresverlauf beprobt wurden, konnten sich verändernde Muster der bakteriellen Gemeinschaften beobachtet werden (Redford & Fierer 2009). Auch in Studien an Salatpflanzen, wurden klare Unterschiede zwischen Sommer- und Herbst/Winter-Proben sowohl in der Abundanz als auch in der Zusammensetzung der Phyllosphärenbakterien gefunden (Rastogi et al. 2012, Williams et al. 2013). Weiterhin wurde hier auch der Einfluss eines markanten Wetterereignisses (Sturm) auf die bakteriellen Gemeinschaften dokumentiert (Rastogi et al. 2012).

Ebenso scheinen sich landwirtschaftliche Anbaumethoden auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften auf Pflanzen auszuwirken. In einem Vergleich zwischen konventionell und ökologisch angebautem Obst und Gemüse zeigte sich, dass die unterschiedlichen Produktionsbedingungen zu Unterschieden in den bakteriellen Gemeinschaften auf den unterschiedlichen Frucht- und Gemüsesorten führten (Leff & Fierer 2013). Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich der zusätzliche Eintrag von Chemikalien zum Pflanzenschutz auf die verschiedenen Bakterien auswirkt. So wurde auch auf Paprikapflanzen nach Applikation eines Pflanzenschutzmittels eine Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen

festgestellt (Zhang et al. 2009). Ein solcher Befund wurde auch in einer Studie mit Raps beobachtet, in der außerdem Bakterien isoliert wurden, die bestimmte Pestizide abbauen können (Ning et al. 2010).

Zusätzlich wurde bereits in vielen Studien die Pflanzenart oder sogar der Genotyp als determinierender Faktor der Phyllosphärengemeinschaften erkannt (Izhaki et al. 2013, Kim et al. 2012, Knief et al. 2010a, Redford et al. 2010, Hunter et al. 2010, Correa et al. 2007, Lambais 2006). Es wurde wiederholt beobachtet, dass Pflanzen unterschiedlicher Spezies bestimmte bakterielle Gemeinschaften beherbergen, die sich von denen anderer Pflanzen unterscheiden. Sowohl in tropischen Habitaten (Lambais 2006, Kim et al. 2012) als auch in temperaten Regionen (Izhaki et al. 2013, Redford et al. 2010) wurden Muster gefunden, bei denen die interspezifische Varianz der Gemeinschaften die der intraspezifischen Varianz überschritt. Redford et al. (2010) fanden sogar eine grobe Korrelation zwischen der Phylogenie der Pflanzen und der Phylogenie der bakteriellen Gemeinschaften. Interessanterweise scheinen diese Effekte auch eine Angleichung unterschiedlicher, auf die Pflanze aufgebrachteter bakterieller Konsortien zu bewirken. So wurde bei Tomaten beobachtet, dass trotz Sprühbewässerung aus Wasserquellen, die sehr unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften enthielten, zum Erntezeitpunkt gleiche Konsortien auf den Früchten zu finden waren (Telias et al. 2011).

Das alles deutet darauf hin, dass einerseits Umweltbedingungen an verschiedenen Orten und/oder die Verbreitungsfähigkeit bestimmter bakterieller Taxa die Zusammensetzung von mikrobiellen Phyllosphärengemeinschaften mitbestimmen. Außerdem scheinen Witterungseinflüsse, wie sie im Verlauf der Jahreszeiten durch Niederschlagshäufigkeit, unterschiedliche Temperaturen oder Sonneneinstrahlung entstehen, von Bedeutung zu sein. Auch die Pflanzenspezies an sich wird als bestimmender Faktor der Zusammensetzung der Phyllosphärengemeinschaften beobachtet. Vermutlich entstehen die Gemeinschaften in der Phyllosphäre aber durch ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren (Knief et al. 2010a, Finkel et al. 2011, Rastogi et al. 2012, Williams et al. 2013, Abb. 2a). Es ist allgemein bekannt, dass verschiedene Bakterien unterschiedliche Ansprüche an ihre Lebensbedingungen stellen. Das könnte einen Teil der Reaktionen der bakteriellen Gemeinschaften auf veränderte Standort-, Wetter- oder durch die Pflanzenart vorgegebenen Bedingungen erklären.

Auch weiß man, dass sich Bakterien in komplexen Konsortien gegenseitig beeinflussen können (Knief et al. 2010b, Williams et al. 2013). So wurde das *quorum sensing*, das auf der Wahrnehmung unterschiedlicher N-acyl-Homoserinlactone durch Bakterien basiert, als wichtiger Steuerungsmechanismus für die Populationsentwicklung einzelner Stämme aber auch als Interferenzmechanismus im Zusammenleben unterschiedlicher Stämme erkannt (Shepherd & Lindow 2009, Dulla & Lindow 2009, Ma et al. 2013). Zusätzlich können solche Signale auch von Pflanzen erkannt werden, die darauf mit Abwehrreaktionen reagieren können (Hartmann & Schikora 2012). Solche Abwehrreaktionen, die auch durch nicht-pathogene Bakterien ausgelöst werden können (Kürkcüoğlu et al. 2007), könnten einzelne Gemeinschaftsmitglieder beeinflussen. Weitere Faktoren, wie die Produktion antimikrobieller Substanzen oder Konkurrenz um Nahrung, können ebenfalls zu Verschiebungen oder gegenseitigem Ausschluss in der bakteriellen Gemeinschaft führen (Ji & Wilson 2002, Stockwell et al. 2002, Hibbing et al. 2010, Wilson & Lindow 1994). So wurden antagonistische Effekte kommensaler, pflanzenassoziierter Bakterienstämme auf pflanzenpathogene Stämme dokumentiert, jedoch noch nicht im Detail aufgeklärt (Vogel et al. 2012, Innerebner et al. 2011, Huang et al. 2012). Weiterhin gibt es Interaktionen zwischen Pilzen und Bakterien auf der Pflanzenoberfläche. So wurde bei Befall durch Mehltau die bakterielle Besiedelung auf

Pflanzenoberflächen verändert (Suda et al. 2009). Genaue Mechanismen, die das Überleben bestimmter Bakterienspezies in einer Gemeinschaft auf Pflanzenoberflächen bestimmen, liegen jedoch für den Bereich der Phyllosphäre noch im Dunkeln.

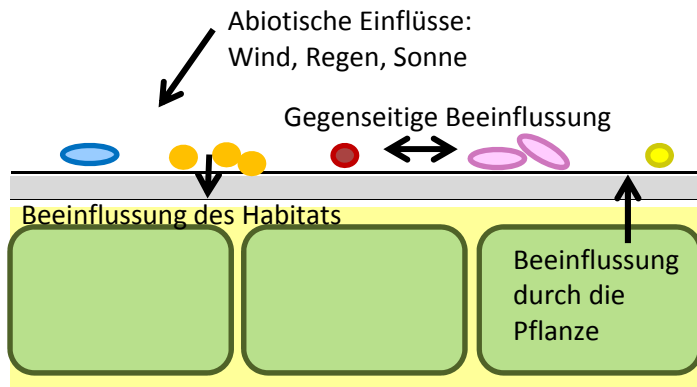


Abb. 2a: Schematische Darstellung des Phyllosphärenhabitats und der Einflussfaktoren durch bzw. auf dort lebende Bakterien.

2.3 Einflüsse der pflanzlichen Oberfläche

Die Pflanzenart kann mehrere unterschiedliche Einflüsse auf die sie besiedelnden Bakterien kombinieren. Verschiedene Pflanzenarten unterscheiden sich unter anderem durch Blattformen, Wuchshöhen, Vegetationszeiten, Blühzeitpunkte und die Produktion verschiedenster Sekundärmetabolite. Auf einigen Salatsorten, die sich durch Blattmorphologie, Zucker- und Mineraliengehalt unterscheiden, wurden deutlich verschiedene bakterielle Populationen beobachtet (Hunter et al. 2010). Allerdings gelang es auch in dieser Studie nicht, die Effekte einzelner Faktoren genauer abzugrenzen, da die verwendeten Sorten immer eine Kombination von veränderten Eigenschaften mit sich brachten.

Allein die Pflanzenoberfläche weist viele Charakteristika auf, deren Einfluss auf Bakterien noch weitgehend unerforscht ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf Untersuchungen zum Einfluss bestimmter Oberflächencharakteristika der Pflanzen auf die bakteriellen Gemeinschaften der Pflanzenoberfläche gelegt. Ein wichtiger Aspekt dabei war, dass diese Oberflächencharakteristika möglichst unabhängig von anderen Faktoren untersucht werden sollten. Deshalb wurden die Untersuchungen an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die Pflanze ist physiologisch gut charakterisiert und es ist eine Fülle verschiedener Mutantenlinien und Ökotypen verfügbar. Solche Pflanzenlinien bieten den Vorteil, dass bestimmte Charakteristika in den Mutanten vorliegen, nicht aber auf dem zugehörigen Wildtyp mit gleichem genetischen Hintergrund. Dadurch lassen sich, anders als auf divers genetisch veränderten Zuchtformen von Pflanzen, die Effekte der gewünschten Eigenschaften weitgehend isoliert untersuchen.

Ein hervorstechendes Merkmal mancher Pflanzenoberflächen ist deren Behaarung. Trichome sind Zellen der pflanzlichen Epidermis, die verschiedenste Formen haben können und unterschiedliche Funktionen erfüllen. Trichome können ein- oder mehrzellig sein und Drüsenfunktion haben oder

nicht (Dalin et al. 2008, Wagner et al. 2004, Johnson 1975). So können sie zum Transpirationsschutz durch die Vergrößerung der Luftgrenzschicht zwischen Pflanze und Atmosphäre beitragen, sowie UV- bzw. Starklichtschutz-Effekte haben. Außerdem können vor allem drüsige Trichome zum Schutz der Pflanzen vor Fraßfeinden und Pilzen beitragen (Tian et al. 2012, Valkama et al. 2005). Drüsige Trichome geben häufig antimikrobielle oder insektenabwehrende Substanzen wie ätherische Öle ab, die Terpenoide oder Flavonoide enthalten. Solche Substanzen können allerdings spezialisierten Insekten auch zur Wirtsfindung dienen (Wagner 1991, Beninger & Abou-Zaid 1997, Roda et al. 2003). Für die nicht-drüsigen Trichome von *A. thaliana* wurde berichtet, dass Pflanzen mit dichterem Behaarung anfälliger für den phytopathogenen Pilz *Botrytis cinerea* waren (Calo et al. 2006). Andererseits wurden in den Trichomen von *A. thaliana* Gene der Anthocyan-, Flavonoid- und Glucosinolat-Biosynthese exprimiert gefunden, was auf eine Funktion der Trichome in der biotischen Abwehr hinweist (Jakoby et al. 2008).

Hinsichtlich der bakteriellen Besiedelung wurde allerdings beobachtet, dass verschiedene Arten von Trichomen offenbar einen bevorzugten Ort der Ansiedelung von Bakterien darstellen. Bakterielle Aggregate wurden oft am Fuß von Trichomen beschrieben (Barak et al. 2011, Baldotto & Olivares 2008, Monier & Lindow 2004, Morris et al. 1997). Zudem wurde eine höhere Dichte an Trichomen auf verschiedenen mediterranen Pflanzen mit einer höheren Anzahl von Bakterien auf den Blättern der jeweiligen Pflanzen korreliert (Yadav et al. 2005). Auch auf haarlosen Tomatenmutanten wurden geringere Populationsentwicklungen eines pathogenen Bakteriums beobachtet, als auf behaarten Vergleichspflanzen (Schneider & Grogan 1977). Es ist bekannt, dass die Kutikula am Fuß von Trichomen einiger Pflanzen durchlässiger für Wasser und gelöste Substanzen ist, als an anderen Stellen des Blatts (Schlegel et al. 2005). Diese Orte scheinen daher für Bakterien ein erhöhtes Nährstoffangebot bereitzustellen (Remus-Emsermann et al. 2011). Ebenso wurden UV-abschirmende oder Feuchtigkeit zurückhaltende Effekte von Trichomen auf epiphytische Bakterien diskutiert (Jacobs & Sundin 2001). Somit wäre durchaus denkbar, dass auch die nicht-drüsigen Trichome von *A. thaliana* einen bevorzugten Besiedelungsort von Bakterien darstellen. Dadurch oder durch die mögliche Produktion antimikrobieller Substanzen in den Haaren könnte auch die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften auf den Blättern von *A. thaliana* beeinflusst werden.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die bakterielle Besiedelung könnte die Beschaffenheit der oberirdischen Teile der pflanzlichen Kutikula sein. Sie bildet die äußerste Grenzschicht der pflanzlichen Organismen und ist der Epidermis aufgelagert (Jeffree 2006, Abb. 2b). Die eigentliche Kutikula lässt sich meist in mehrere Schichten gliedern. Die unterste Schicht („cuticle layer“) besteht im Wesentlichen aus Cutan und veresterten Cutinsäuren, die eine stabile Cutinmatrix bilden. Die obere Schicht („cuticle proper“) enthält in dieser Cutinmatrix verstärkt eingelagerte intrakutikuläre Wachse. Darauf aufgelagert sind die sogenannten epikutikulären Wachse. Die kutikulären Wachse bestehen aus komplexen und je nach Pflanzenart individuellen Gemischen langkettiger aliphatischer Fettsäuren und ihren Derivaten mit Kettenlängen zwischen C20 und C40 (Jetter et al. 2006). Die Wachsgemische können auch Triterpenoide, Flavonoide und Sterole enthalten. Die Wachse der meisten Pflanzen bestehen allerdings aus langkettigen Alkanen, Fettsäuren, Alkoholen, Aldehyden sowie auch sekundären Alkoholen, Diolen oder Ketonen. Zusätzlich finden sich häufig auch Wachsester aus Alkoholen und Fettsäuren.

Die aliphatischen Wachse werden in der Wachsbiosynthese der Pflanzen gebildet, die zunächst im Stroma der Plastiden beginnt (Kunst et al. 2006, Bernard & Joubès 2013). Hier wird Malonyl-CoA an die Acyl-Carrier-Protein(ACP)-Domäne eines Fettsäuresynthasekomplexes gebunden und durch

mehrere enzymatische Schritte eine Acyl-Kettenverlängerung durch die sukzessive Kondensation und Reduktion von Malonyl-ACP-Resten erreicht. Insgesamt werden durch die Beteiligung von drei Fettsäuresynthasekomplexen die Acylketten bis zu 16 oder 18 C-Atomen verlängert. Die entstandenen Fettsäureketten werden aus den Plastiden exportiert, durch die Bindung an Coenzym-A aktiviert und an Fettsäureverlängerungskomplexen am ER sukzessive durch Anlagerung von MalonylCoA-Resten um jeweils 2 C-Atome verlängert. Hier können Kettenlängen von bis zu 40 C-Atomen entstehen. Diese können über weitere enzymatische Reaktionen in Derivate wie Alkane, Alkohole oder Ester umgewandelt werden. Bislang sind aber noch nicht alle beteiligten Komponenten und ihr Zusammenwirken aufgeklärt. Der Export der Lipide aus der Zelle erfolgt offenbar durch ABC-Transporter sowie möglicherweise unter Beteiligung von Lipidtransferproteinen in die Zellwand und Kutikula. Die epikutikulären Wachse bilden eine hydrophobe Oberfläche aus, die, je nach Pflanzenart, als dünner Wachsfilm mit glatter Feinstruktur oder auch als Landschaften aus Kristalloiden verschiedenster Formen ausgeprägt sein können (Abb. 2b). Der bekannte Lotus-Effekt geht auf Waskristalloide zurück, die auf den Blättern sowohl durch ihre wasserabweisenden Eigenschaften als auch durch die besondere Struktur der Kristalle eine superhydrophobe Oberfläche schaffen, auf der Wasser vollständig abperlt (Barthlott & Neinhuis 1997).

Die Kutikula übernimmt wichtige Aufgaben für den pflanzlichen Organismus. So stellt sie vor allem eine Transpirationsbarriere dar, durch die der Wasser- und Gasaustausch der Pflanzen gezielt auf die Stomata gelenkt wird, wo er kontrolliert ablaufen kann (Riederer 2006). Ebenfalls über die Kutikula kann der Austausch vor allem lipophiler Substanzen erfolgen, sie kann zur Reflexion zu hoher Strahlungsintensitäten beitragen und als separierende Schicht in der pflanzlichen Organentwicklung von Bedeutung sein. Zudem stellt sie die erste Barriere gegen feindliche Angriffe von Herbivoren und anderen Organismen dar und fungiert als primäre Kontaktfläche zwischen Pflanzen und ihrer oberirdischen Umwelt.

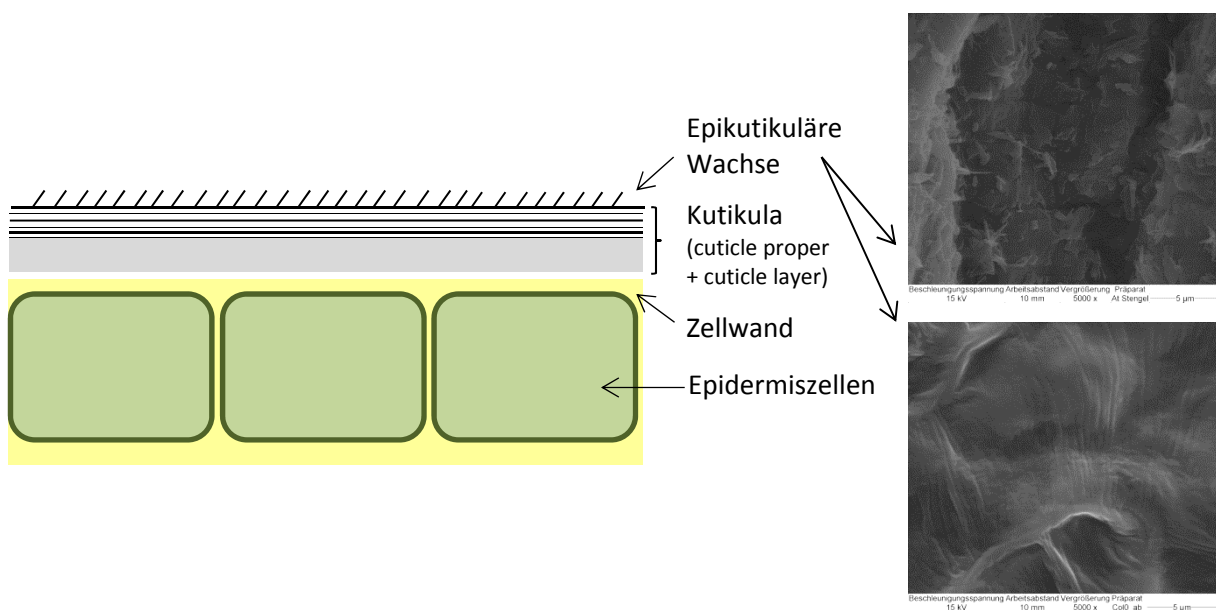


Abb. 2b: Links: Schematische Darstellung der pflanzlichen Epidermis mit aufgelagerter Kutikula. Rechts: REM-Aufnahmen von *A. thaliana* Stengel (oben) und Blattwachsen (unten).

Von einigen phytopathogenen Pilzen ist bekannt, dass bestimmte Komponenten der epikutikulären Wachse der Wirtspflanzen eine fördernde Wirkung auf die ersten Entwicklungsschritte der Pilze auf der Pflanzenoberfläche haben (Tsuba et al. 2002, Hansjakob et al. 2010). Erste Untersuchungen von Einflüssen der Wachsbelegung auf Phylloosphärenbakterien ergaben Unterschiede für die Anheftungs- und Vermehrungseffizienz von inokulierten Bakterienstämmen auf unterschiedlichen Maismutanten (Marcell & Beattie 2002). Diese Maismutanten wiesen deutliche Unterschiede in der elektronenmikroskopisch analysierten Struktur ihrer Wachsbelegung, der Wachsmenge und der Benetzbarkeit auf (Beattie & Marcell 2002). Reduzierte Wasserbenetzbarkeit über einem Kontaktwinkel-Schwellenwert von 140° führte zu reduzierter Anheftungsfähigkeit der aufgetragenen Bakterien (Marcell & Beattie 2002). Erhöhte Wachstumsraten nach der Anheftung von Bakterien wurden auf unterschiedliche Wachsmorphologie und -dichte der Mutanten und damit verbundene, verbesserte Nährstoffzugänglichkeit für die Bakterien zurückgeführt. Diese Studien analysierten jedoch nicht die Zusammensetzung der epikutikulären Wachse der verschiedenen Linien. Außerdem bezogen sie sich ausschließlich auf das Wachstum inokulierter Bakterienstämme.

Allerdings könnte auch die Zusammensetzung der Wachsbestandteile z.B. durch veränderte Diffusion von Substanzen durch die Kutikula (Vogg et al. 2004) Auswirkungen auf die bakterielle Besiedelung haben. In der vorliegenden Arbeit waren vor allem Effekte im Zusammenhang mit einem natürlichen Besiedelungsprozess der Pflanzen von Interesse, da gerade im natürlichen Umfeld spezies-spezifische bakterielle Konsortien auf Pflanzen beobachtet worden waren (Knief et al. 2010a, Redford et al. 2010, Lambais 2006, Kim et al. 2012, Izhaki et al. 2013). Daher sollte die Frage geklärt werden, ob die kutikulären Wachse in diesem Selektionsprozess eine Rolle spielen könnten.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die pflanzlichen Oberflächen eines der, auf die Fläche bezogen, größten globalen Habitate für Mikroorganismen ausmachen, sind die Faktoren, die zur Ausbildung bestimmter mikrobieller Konsortien beitragen, nach wie vor nicht genügend aufgeklärt. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, einzelne Charakteristika der pflanzlichen Oberfläche hinsichtlich ihrer Effekte auf die natürliche bakterielle Besiedelung zu untersuchen. Durch die Verwendung von Mutantenlinien der Ackerschmalwand (*A. thaliana*) im Vergleich zum Wildtyp sollte möglichst gezielt der Einfluss einzelner Faktoren auf bakterielle Gemeinschaften betrachtet werden.

Zunächst sollte ein erster Einblick in die natürliche Besiedelung der *A. thaliana*-Phyllosphäre erlangt werden. Dabei wurde ein Vergleich der bakteriellen Besiedelung nach Anzucht unter kontrollierten Bedingungen im Klimaschrank und nach Anzucht im Freiland angestrebt. Es sollten dabei kultivierungsbasierte Methoden zum Einsatz kommen, um so Isolate für mögliche, nachfolgende Inokulationsexperimente zu gewinnen. Weiterhin sollten Bakterien aus der Phyllosphäre isoliert werden, die Bestandteile der kutikulären Wachse von Pflanzen als Nahrungsquelle nutzen konnten.

Als häufig vorhandenes Oberflächencharakteristikum von Pflanzen sollte der Einfluss der einfachen, nicht-drüsigen Haare von *A. thaliana* auf die bakterielle Besiedelung ihrer Blätter untersucht werden. Dabei sollte herausgearbeitet werden, ob die Trichome des Wildtyps die Dichte und/oder die Diversität der natürlich einwandernden epiphytischen Besiedelung im Vergleich zur nicht behaarten *g/1*-Mutante verändern. Die Analyse der kutikulären Wachse der beiden Pflanzenlinien sollte klären, ob hier zusätzliche chemische Veränderungen der Oberfläche vorlagen. Die minimale bakterielle Besiedelung der Pflanzen im Klimaschrank sowie die Besiedelung nach einer vierwöchigen Freilandperiode sollte untersucht und verglichen werden. Es sollten Gesamtzellquantifizierungen der bakteriellen Gemeinschaften von Wildtyp-Pflanzen und der trichomlosen Mutante vorgenommen werden. Weiterhin sollte die Denaturierenden Gradientengelelektrophorese verwendet werden, um die Diversität der Gemeinschaften der beiden Pflanzenlinien kultivierungsunabhängig miteinander zu vergleichen.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses kutikulärer Wachse auf die mikrobielle Besiedelung. Es sollten dafür Mutanten von *A. thaliana* verwendet werden, die Unterschiede in der kutikulären Wachszusammensetzung ihrer Blätter aufwiesen. Nach Analyse der kutikulären Wachszusammensetzung sollte die Quantität der bakteriellen Gemeinschaften über DAPI-Zählungen ermittelt und die bakterielle Diversität mittels DGGE dokumentiert werden. Weiterführend sollte hier die Technik der Amplicon-Pyrosequenzierung zum Einsatz kommen, die einen wesentlich genaueren Einblick in die bakteriellen Gemeinschaften der Pflanzen erlauben sollte.

3. Methoden

3.1 Allgemeine Erläuterungen zu Vorgehensweise und Methoden

Gegenstand der mikrobiologischen Untersuchungen waren epiphytische, *A. thaliana* Blattoberflächen assoziierte, bakterielle Gemeinschaften. Stängel und Blüten der Pflanzen, Pilze sowie endophytische Bakteriengemeinschaften wurden nicht untersucht. Eine geringfügige Ergänzung der epiphytisch lebenden Bakterien durch Endophyten kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden, da durch die verwendete Technik zur Isolierung der Bakteriengemeinschaften (Blattabwasch) die Pflanzen minimal verletzt worden sein können. Dadurch bedingt kam es auch zu Kontaminationen durch Chloroplasten. Dennoch entspricht die verwendete Ablösemethode der bakteriellen Gemeinschaften dem derzeitigen Standard (z. B. Leveau et al. 2006, Bodenhausen et al. 2013). Um zudem die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden in allen durchgeführten Versuchen Replikat-Proben analysiert und für alle untersuchten Pflanzen die gleiche Ablösemethode verwendet.

Es wurden Pflanzen zum einen unter kontrollierten Klimabedingungen im Klimaschrank angezogen, sowie zudem nach einem vierwöchigen Freilandaufenthalt untersucht. Da die Phyllosphäre eine im Vergleich zu Bodenhabitaten geringe bakterielle Besiedelung aufweist, wurden für die Versuche vergleichsweise große Rosetten von *A. thaliana* benötigt, die sich nach etwa 10-12 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen entwickelten. Da diese Entwicklung im Freiland unter nicht kontrollierten Bedingungen verläuft und die Pflanzen dort generell kleiner bleiben, wurden für die Freilandaufenthalte die Pflanzen unter kontrollierten Klimabedingungen vor-angezogen. Kontrollierte Anzuchtbedingungen bieten Vorteile wie beispielsweise die Unabhängigkeit von Jahreszeiten und die Möglichkeit gezielt manipulierbarer Umweltbedingungen für die Pflanzen. Freilandbedingungen wiederum eröffnen die Möglichkeit einer naturnäheren Kolonisierung durch Bakterien. Andererseits könnten bei im Freiland gewachsenen Pflanzen durch Regen oder Wind sowie durch direkten Kontakt der Rosettenblätter mit dem Pflanzsubstrat, bodenlebende Bakterien auf die Blätter der Pflanzen gelangt sein. Dieser Einfluss wurde minimiert, indem nur solche Blätter untersucht wurden, die keinen direkten Kontakt mit dem Substrat hatten. Der Eintrag von Bakterien durch Wind und Regen ist allerdings ein natürlicher Vorgang und wurde daher nicht eingeschränkt.

Um die möglichen Einflüsse der nicht-drüsigen Haare von *A. thaliana* auf die bakterielle Besiedelung der Blätter zu untersuchen wurden im Rahmen meiner Promotion zwei Pflanzenlinien verwendet. Der Wildtyp Col-0 wies normale Behaarung auf und die *gl1*-Mutante bildete auf ihren Blättern keine Trichome aus. Soweit bekannt, betrifft die Mutation der *gl1*-Linie ausschließlich *GLABROUS1*, einen MYB-Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung von Trichomen initiiert (Hauser et al. 2001). Dementsprechend können von *gl1*-Pflanzen keine Trichome gebildet werden.

Um mögliche Einflüsse der chemischen Wachszusammensetzung auf die natürlich einwandernde bakterielle Besiedelung von Pflanzenoberflächen zu untersuchen, wurden ebenfalls mutagen-induzierte Mutantenlinien von *A. thaliana* in Landsberg *erecta* Hintergrund verwendet, die einen charakteristischen „Wachspheänotyp“ aufwiesen. Dieser Phänotyp beschränkt sich, soweit bisher beschrieben, auf die epikutikulären Wachse der Pflanzen und wird vor allem erkennbar durch einen glänzend grünen Blütenstängel der Mutanten. Wildtyppflanzen hingegen weisen einen gräulich bereift erscheinenden Stängel auf (Koorneef et al. 1989). Diese optische Veränderung führte auch zur

Bezeichnung „*eceriferum*“ (*cer*) also „kein Wachs tragend“. Tatsächlich tragen diese Pflanzen aber nur weniger Wachs als der Wildtyp und weniger bis keine Kristalloide auf ihren Stängeloberflächen. Einige dieser Mutantenlinien weisen auch auf ihren Blättern eine chemische Veränderung ihrer kutikulären Wachse im Vergleich zum Wildtyp auf. Diese ist zwar im Vergleich zum Stängel mit bloßem Auge nicht erkennbar, aber eine chemische Analyse zeigte erheblich veränderte Mengenverhältnisse der vorhandenen Einzelkomponenten in den kutikulären Wachsen (Jenks et al. 1995).

Es wurden vier verschiedene *cer*-Mutanten (*cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16*) ausgewählt, die laut Literaturdaten besonders markante Veränderungen in den kutikulären Wachsen ihrer Blätter aufwiesen (Jenks et al. 1995). Von den mutierten, an den Prozessen der Wachsbiosynthese beteiligten Genen ist bekannt, dass *CER1* eine putative Aldehyd-Decarboxylase codiert, *CER6* eine beta-Ketoacyl-CoA-Synthase und *CER9* eine putative E3-Ubiquitin-Ligase (Bernard & Joubès 2013). Über den Locus der *cer16*-Mutation ist noch nichts bekannt. All diese Gene tragen im Wildtyp zu einer artspezifischen Wachsbiosynthese bei. Auf den Blättern entsteht dadurch bei *A. thaliana* ein vergleichsweise dünner Wachsfilm, der hauptsächlich Alkane, Fettsäuren und Alkylalkohole enthält (Jenks et al. 2002). Durch die verschiedenen Mutationen, die nur bestimmte an der Wachsbiosynthese beteiligte Proteine betreffen, kommt es zu charakteristischen Verschiebungen der noch gebildeten und exportierten Wachsbestandteile (Bernard & Joubès 2013).

Von allen verwendeten Pflanzenlinien wurden Wachsanalysen in 3-4 biologischen Replikaten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10-20 Blätter von 1-3 Pflanzen je Replikat für einen Wachsextrakt verwendet. Für die Analysen der mikrobiellen Konsortien wurde jeweils die von den Blättern einer Pflanze abgewaschene bakterielle Gemeinschaft als ein biologisches Replikat angesehen. Es wurden hier ebenfalls in der Regel 3-4 biologische Replikate je Pflanzenlinie untersucht. Mit diesen wurden, je nach Fragestellung, Kultivierungsversuche, Gesamtzellquantifizierung, DGGE-Analysen und Ampliconsequenzierung durchgeführt. Im Folgenden wird schematisch das Vorgehen für ein biologisches Replikat einer Pflanzenlinie dargestellt (Abb. 3). Auf die Darstellung von Anschlussaktivitäten, wie die Identifizierung der Isolate nach Kultivierung oder die Bandensequenzierung nach DGGE, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

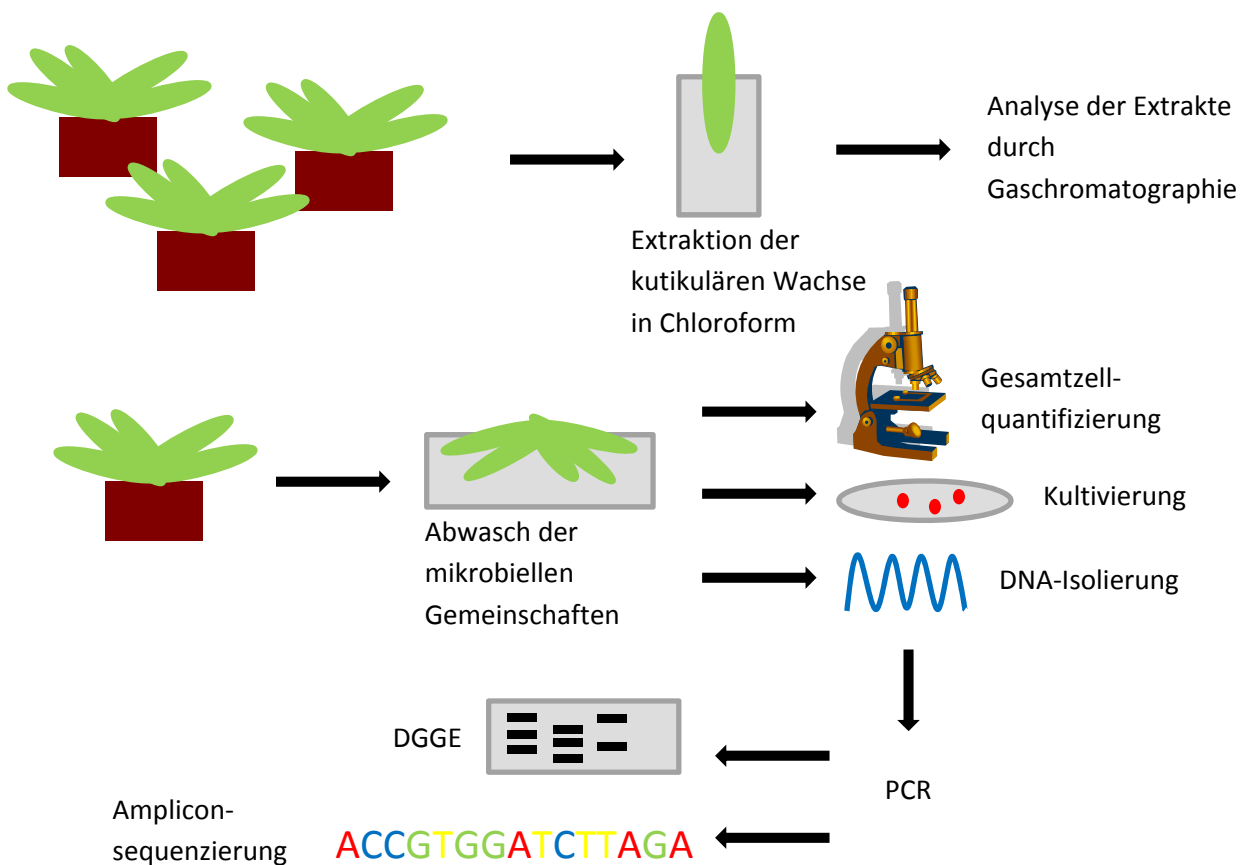


Abb. 3: Schematische Darstellung der durchgeführten Analysen für jeweils ein biologisches Replikat. Für die Wachsanalysen wurden pro Replikat Blätter von 1-3 Pflanzen zusammen extrahiert. Für die Analysen der bakteriellen Gemeinschaften wurden pro Replikat die Blätter einer Pflanze verwendet. Auf die Darstellung von Folgeanalysen, wie z.B. die Identifizierung der Isolate durch Sequenzierung, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften auf *A. thaliana* Blattoberflächen wurde vorwiegend kultivierungsunabhängig, das heißt nur auf der DNA der Mikroorganismen basierend, ohne Kultivierungsschritte durchgeführt. Das birgt den Vorteil, dass damit auch ein Einblick in die große Masse nicht kultivierbarer Bakterien möglich ist (Müller & Ruppel 2013). Der nicht kultivierbare Anteil aller Bakterien in der Natur wird auf 90- 99% geschätzt (Handelsman & Smalla 2003). Einerseits wurde die bewährte Technik der Denaturierenden Gradientengelelektrophorese verwendet (Muyzer & Smalla 1998). Hierbei wird mittels PCR aus der mikrobiellen DNA einer Gemeinschaft als Grundlage, ein Bereich des bakteriellen 16S SSU rRNA-Gens amplifiziert, das wegen seiner Verbindung konservierter und hochvariabler Bereiche als phylogenetischer Marker im Feld der mikrobiellen Ökologie genutzt wird (Giovannoni et al. 1990, Amann et al. 1995). Es kommen dabei universelle Primer zum Einsatz, die idealerweise alle, in der mikrobiellen Gemeinschaft vorliegenden 16S rRNA Gene erfassen. Die resultierenden Amplifikate werden anschließend über einen denaturierenden Gradienten in einem Polyacrylamidgel ihren Schmelzeigenschaften und damit Sequenzeigenschaften entsprechend aufgetrennt. Durch Färbung der DNA können schließlich Bandenprofile sichtbar gemacht werden, die einen Überblick über die Hauptmitglieder der bakteriellen Gemeinschaft geben, aber durch die fluoreszenzbasierte Visualisierung der DNA ein vergleichsweise hohes Detektionslimit aufweisen. Jedoch erlaubt die Technik den Vergleich mehrerer Gemeinschaften miteinander. Für weiterführende phylogenetische Identifizierungen der Bakterien müssen die einzelnen Amplifikatbanden aber ausgeschnitten und einzeln sequenziert werden.

Weiterhin kam die modernere Methode der Amplicon-Pyrosequenzierung zum Einsatz. Der erste Schritt der Technik entspricht im Wesentlichen dem der DGGE. Mittels PCR wird ein Abschnitt des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifiziert, jedoch danach nicht aufgetrennt sondern unmittelbar sequenziert. Die Sequenzen werden dadurch gewonnen, dass die DNA-Abschnitte an mikro-Träger gebunden werden, sodass jeder Träger nur eine Ausgangssequenz aus dem Amplifikat enthält (Sogin et al. 2006). Nach einer weiteren PCR, die die DNA auf den einzelnen Trägern amplifiziert, können diese dann einzeln in die Aussparungen einer Pikotiterplatte eingebracht werden. Dort erfolgt die Sequenzierung durch Synthese. Beim Einbau eines Nukleotids wird Pyrophosphat freigesetzt. Dieses führt durch die Reaktion zweier Enzyme in der Reaktionsmischung zur Aussendung eines Lichtblitzes (Ronaghi et al. 1998). Die Nukleotide werden einzeln in bestimmter Reihenfolge über die Platte perfundiert und ihr Einbau durch die entstehenden Lichtblitze dokumentiert. So können parallel hunderttausende Sequenzen abgelesen werden, was mit älteren Methoden nicht möglich war (Poisot et al. 2013, Logares et al. 2012, Sogin et al. 2006). Da die Technik nicht durch die Sichtbarmachung der DNA im Gel limitiert ist, können zudem auch einzelne Sequenzen in einer Probe erfasst werden.

Trotz allem gibt es mögliche Fehlerquellen: Diese treten zum einen dadurch auf, dass die Methode nach wie vor PCR-basiert ist. Durch die PCR eingeführte Gewichtungen, wie z.B. bevorzugt amplifizierte Sequenzen, an die sich die Primer besser anlagern können als an andere Sequenzen, die Bildung von Chimären oder Lesefehler der Polymerasen, werden mit erfasst (Logares et al. 2012, Kunin et al. 2010, Amend et al. 2010, Lee et al. 2012). Auch ist bekannt, dass durch die Sequenzierung selbst Fehler, wie z.B. falsch interpretierte Homopolymerlängen, nicht eindeutig identifizierte Basen oder die Nichtregistrierung eines Baseneinbaus eingeführt werden können (Brockman et al. 2008, Quince et al. 2009, Kunin et al. 2010, Glenn 2011). Die Fehlerrate der Pyrosequenzierung liegt bei etwa 1% (Glenn 2011). Die neu eingeführte PacBio-Sequenzierung, welche keine vorangehende PCR mehr erfordert und sehr lange (ca. 1000bp) Sequenzen produziert, weist aber sogar eine Fehlerrate von 16% auf. Daher erschien die Pyrosequenzierung für die vorliegende Arbeit, bei der Sequenziergenauigkeit über die Identifizierung von Phylotypen entschied, die bessere Alternative. Auch die Illumina- oder die SOLiD-Sequenzierung, die zwar höhere Genauigkeiten (0,01-0,1% Fehlerrate) aufweisen, jedoch nur sehr kurze Sequenzen (>150bp) liefern, wurde aufgrund der Sequenzlänge als schlechtere Alternative gegenüber der Pyrosequenzierung erwogen (Glenn 2011, Luo et al. 2012, Pedrós-Alió 2012, Poisot et al. 2013).

Alle in diesem Teil genannten Organismen, Materialien, Chemikalien, Geräte, Kits, Software, Primer, Lösungen und Medien sind im Anhang (7.2, 7.3 und 7.4) tabellarisch mit Hersteller, Referenz und/oder Bezugsquelle aufgeführt.

3.2 Pflanzenanzucht

Es wurden für die Experimente mehrere stabile Mutanten von *A. thaliana* sowie die jeweils zugehörigen Wildtyplinien verwendet. Für den Vergleich der bakteriellen Diversität auf normalen und trichomfreien Arabidopsisblättern wurden der Wildtyp Col-0 und die annähernd trichomfreie *g/1*-Mutante in Col-0 Hintergrund verwendet (Abb. 4). Für die Untersuchungen zum Einfluss kutikulärer Wachse auf die Diversität der Phyllosphärenbakterien wurden der Landsberg *erecta* (Ler) Wildtyp sowie vier *eceriferum*-Mutanten (*cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16*; Koornneef et al. 1989) angezogen (Abb. 4).



Abb. 4: Im Klimaschrank angezogene Col-0 (A), *g/1* (B) und Ler (C)-Pflanzen. Die *cer*-Mutanten waren phänotypisch vom Ler-Wildtyp nicht zu unterscheiden.

Das bei 4°C gelagerte Saatgut der verwendeten Arabidopsislinien wurde vor jeder Aussaat oberflächensterilisiert (siehe 7.2.2). Die Aussaat der Samen erfolgte auf ein zuvor autoklaviertes Erde-Sand-Vermiculite-Gemisch im Verhältnis 10:0,5:0,5. Als Anzuchttöpfe wurden 7,5 cm Kunststofftöpfe verwendet, welche ebenfalls vor dem Gebrauch autoklaviert wurden. Die Töpfe wurden in 20 x 30 cm Kunststoffschalen gestellt, welche durch eine Behandlung mit Bacillo® desinfiziert worden waren. Die Bewässerung erfolgte von unten über in die Schalen gegossenes Leitungswasser. Nach etwa drei Wochen wurden die Keimlinge pikiert und in Einzeltöpfen weiterkultiviert. Das Temperatur- und Belichtungsprogramm war während der gesamten Klimaschrankkultivierung wie folgt eingestellt: Auf 9 Stunden Tag bei einer Belichtungsstärke von $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von 21 °C folgten 15 Stunden Nacht bei 18 °C und jeweils 70% relativer Luftfeuchte (Abb. 5B).

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte jeweils für 8-9 Wochen im Klimaschrank. Für die Erfassung der bakteriellen Besiedelung unter kontrollierten Klimabedingungen wurde die Kultivierungsphase auf 10-13 Wochen ausgedehnt. Für Untersuchungen, in denen eine naturnahe Besiedelung der Pflanzen mit Bakterien erwünscht war, wurden die Pflanzen nach 8-9 Wochen Anzucht im Klimaschrank ins Freiland gebracht und dort neben den Anzuchtgewächshäusern des Lehrstuhls für Botanik II (Botanischer Garten Würzburg bei 49° 45,955' N; 009° 55,947' O ± 4m) aufgestellt. Die Pflanzen waren dort für etwa 4 Wochen Außenklimabedingungen ausgesetzt. Bei Bedarf wurden sie mit Regenwasser zusätzlich bewässert oder gestautetes Regenwasser aus den Schalen entleert. Die Freilandwachstumsperioden der Pflanzen erfolgten zwischen Ende April und Mitte Juni der Jahre 2010, 2011 und 2012. Die Witterungsbedingungen waren von Jahr zu Jahr unterschiedlich. Während das Jahr 2010 ein eher feucht-kühles Frühjahr hatte (Temperaturrahmen 5-28°C, 17 Regentage), waren im Jahr 2011 die Temperaturen höher und es gab weniger Niederschläge (5-32°C, 4 Regentage). Im Jahr 2012 herrschten ebenfalls hohe Temperatur und viel Sonnenschein vor (0-35°C, 6 Regentage) (Abb. 5C).

Für die, so weit wie möglich, sterile Anzucht von *A. thaliana* wurden steril hergestellte PE-Kunststoffbecher verwendet, die mit einem Anzuchtmedium für Pflanzen (Anhang 7.3, PM2, Tab. I) ca. 1 cm hoch gefüllt wurden. Die oberflächensterilisierten Samen wurden zunächst auf einer Agarplatte mit einem ähnlichen Medium (Anhang 7.3, PM1, Tab. I) ausgesät und nach 3 Wochen in die Kunststoffbecher pikiert. Diese wurden mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und die Pflanzen im Klimaschrank bei normalen Bedingungen (s.o.) bis zum Erntezeitpunkt nach 10 Wochen kultiviert (Abb. 5A).

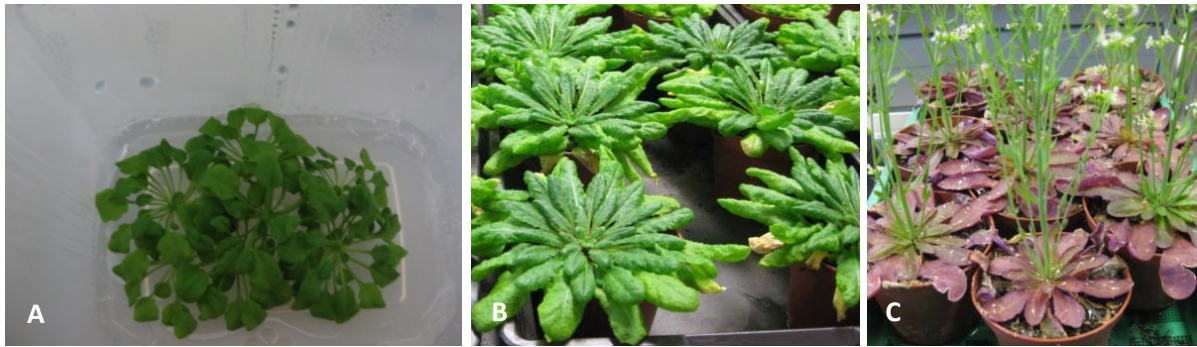


Abb. 5: *A. thaliana*-Pflanzen nach verschiedenen Anzuchtmethoden. A: Steriles Anzuchtgefäß mit mehreren *A. thaliana* Pflanzen. B: Pflanzen nach Kultivierung im Klimaschrank. C: Pflanzen nach Freilandkultivierung.

3.3 Analyse kutikulärer Wachse

Extraktion und Auftrennung kutikulärer Wachse

Für die Analyse der kutikulären Wachse der untersuchten *A. thaliana* Linien wurden 10-14 Wochen alte Pflanzen verwendet. Die Wachse wurden extrahiert, indem mehrere Blätter je Probe nacheinander für jeweils 0,5 – 1 min in 20ml-Glasgefäße mit ca. 10 ml Chloroform bei Raumtemperatur getaucht wurden. Daraufhin wurde jeder Probe eine definierte Menge von C_{24} -Alkan als interner Standard zugegeben. Die Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder gut verschlossen bei 4°C wenige Tage gelagert. Der nächste Schritt der Probenvorbereitung war das Einengen der Proben unter Stickstoffgasstrom um die Lösungsmittelmenge zu reduzieren. Daraufhin erfolgte ein Überführen der Wachsextrakte in 1ml Glasreaktionsgefäße, in denen die Extrakte nun vollständig eingedampft wurden. Daraufhin wurden die Wachsproben mit jeweils 10 μ l BSTFA (Bis-N,O-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) und 10 μ l Pyridin versetzt und 30min bei 70°C derivatisiert. Die Reagenzien bewirkten eine Umsetzung von Hydroxygruppen in den Wachskomponenten in Trimethylsilylester, was die Komponenten leichter flüchtig machte. Die derivatisierten Proben wurden nun in 50-100 μ l Chloroform aufgenommen und jeweils 1-2 μ l direkt eingespritzt über zwei verschiedene gaschromatographische Analysemethoden untersucht:

Für die Identifizierung der in den Proben enthaltenen Komponenten wurde eine massenspektrometrische Analyse gewählt. Dazu wurden die Proben zunächst gaschromatographisch aufgetrennt und über ein nachgeschaltetes Massenspektrometer analysiert. Es wurde eine DB-1HT Säule verwendet und Helium als Trägergas. Folgendes Temperatur- und Druckprogramm wurde zur Auftrennung verwendet:

Temperatur: 2 min bei 50 °C, Rampe1 (40 °C min⁻¹ bis 200 °C), 2 min bei 200 °C, Rampe2 (3 °C min⁻¹ bis 320 °C), 30 min bei 320 °C

Druck: 5 min bei 50 kPa, Rampe (3 kPa m⁻¹ bis 150 kPa), 40 min bei 150 kPa

Für eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Substanzen wurden diese - nach ebenfalls gaschromatografischer Auftrennung - in einen Flammenionisationsdetektor geleitet. Hier wurde eine ZB-1 Säule verwendet und Wasserstoff als Trägergas genutzt. Das hier verwendete Temperatur- und Druckprogramm war Folgendes:

Temperatur: 2 min bei 50 °C, Rampe1 (40 °C min⁻¹ bis 200 °C), 2 min bei 200 °C, Rampe2 (3 °C min⁻¹ bis 320 °C), 30 min bei 320 °C

Druck: 5 min bei 50 kPa, Rampe (3 kPa m⁻¹ bis 150 kPa), 50 min bei 150 kPa

Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren

Die Auswertung der quantitativen Spektren sowie die durch die Analyse mit dem Massenspektrometer erhaltenen Daten wurden mithilfe der ChemStation-Software vorgenommen. Die Identifizierung der einzelnen Komponenten erfolgte im Programm MSD ChemStation durch Vergleiche ihrer Massenspektren mit den Massenspektren authentischer Standards oder Literaturdaten. Die quantitative Analyse der Wachszusammensetzung erfolgte mithilfe der durch den Flammenionisationsdetektor erhaltenen Spektren. Über Software-gestützte manuelle Integration der Peakflächen der einzelnen Komponenten im Programm GC ChemStation (Instrument 1) wurde über den Vergleich mit dem in bekannter Menge zugegebenen internen Standard eine Quantifizierung möglich.

Die für die Berechnung der Wachsmenge je cm² Blattfläche benötigte Flächengröße der extrahierten Blätter wurde wie folgt berechnet: Nach der Behandlung wurden alle Blätter einer Probe auf weißes DIN A4 Papier aufgeklebt. Diese Papiere wurden eingescannt und mittels des „Zauberstab“-Werkzeugs im Programm Adobe Photoshop die Pixelanzahl bestimmt, die die aufgeklebten Blätter umfassten. Mithilfe einer Referenzfläche wurde auf die cm²-Zahl umgerechnet, der die Pixelmenge entsprach. Das Ergebnis wurde mit 2 multipliziert und entsprach damit der ungefähren Gesamtoberfläche der analysierten Blätter. Eine statistische Analyse der Wachsmengenverteilung zwischen den analysierten Pflanzenlinien wurde mithilfe eines Student's T-Test vorgenommen. Dieses erfolgte im Programm STATSTICA.

3.4 Mikroskopie von Blattoberflächen

Rasterelektronenmikroskopie

Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden in der zentralen Abteilung für Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg durchgeführt. Es wurden Oberflächenstrukturen der Blätter sowie Bakterien auf der Blattoberfläche von *A. thaliana* visualisiert. In der Regel wurden dazu Blattstücke auf Elektronenmikroskopie-Tischchen aufgebracht und mindestens über Nacht bei Raumtemperatur ausgetrocknet. Vor der Betrachtung wurden die Proben in einem Sputter-Coater unter Vakuum bei 25mA 3 Mal für 50-100sec mit einer dünnen Schicht auch Palladium-Gold-Partikeln versehen.

Ein Versuch zur Visualisierung inokulierter Bakterien auf *A. thaliana*-Blättern wurde wie folgt durchgeführt: 4 Kolonien des Isolats Do5 (ein in dieser Arbeit isolierter und als *Rhodococcus* identifizierter Stamm) wurden in 200ml Kaliumphosphatpuffer mit 0,002% Silwet® L-77 suspendiert. Von zwei ca. 10 Wochen alten Arabidopsis Ler und *cer1* Pflanzen wurden Blätter in je 2ml Suspension getaucht und für vier Stunden bei Raumtempertur inkubiert. Daraufhin wurden die Blätter der Lösung entnommen und in mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischalen überführt, die verschlossen für drei Tage unter den Bedingungen der Pflanzenanzucht im Klimaschrank inkubiert wurden (s. 3.2). Danach wurden die Blätter über Nacht in Sörensenpuffer oder Karnovsky-Fixierlösung (s. Anhang 7.3, Tab. G) fixiert. In kleinere Stücke geschnitten, wurden die Proben

daraufhin nach 5 maligem Waschen in Sörensenpuffer über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert. Dazu wurden die Blattstücke jeweils 15, 20, 30, 45 min in 30, 50, 70 und 90% Ethanol inkubiert. Abschließend wurden die Blattstücke dann 5 Mal für jeweils 30 min in 100% Ethanol inkubiert und über Nacht dort belassen. Dann erfolgte eine Kritische-Punkt-Trocknung wobei das Ethanol durch wiederholtes Fluten der Druckkammer des Kritischen-Punkt-Trockners mit flüssigem CO₂ ersetzt und die Probe dadurch von Ethanol befreit wurde und unter Raumdruck schließlich trocken war. Die so vorbereiteten Proben wurden wiederum auf Mikroskopie-Tischchen aufgebracht und mit Palladium-Gold besputtert (s.o.) bevor sie im Rasterelektronenmikroskop betrachtet wurden.

Epifluoreszenzmikroskopie

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurden mit DAPI angefärbte Bakterien in Blatt-Abwaschproben quantifiziert (siehe 3.5.3). Weiterhin wurde diese Mikroskopiemethode für *in situ*-Aufnahmen von Phyllospärenbakterien eingesetzt. Dazu wurden Blätter von im Freiland gewachsenen Arabidopsis-Pflanzen mindestens über Nacht in 3,7%iger Formaldehydlösung inkubiert und danach in einer 0,7µg ml⁻¹ DAPI-Lösung die Phyllospärenbakterien angefärbt. Die Blätter wurden auf Objektträger aufgebracht und im Zeiss Axiophot Mikroskop mit einem 100X Ölimmersionsobjektiv und einem DAPI-Fluoreszenzfilter betrachtet und Bilder aufgenommen.

3.5 Analyse phyllospärenassoziierter bakterieller Gemeinschaften

3.5.1 Isolierung von Bakterien

Phyllospärenbakterien wurden wie folgt von den Blättern isoliert: Ganze Blattrosetten oder mehrere Einzelblätter jeweils einer Rosette wurden in 5-10 ml sterilen Kaliumphosphatpuffer (0,1M, pH 7) in einem sterilen 50 ml Kunststoffröhrchen getaucht (Abb. 6). Diese Röhrchen wurden verschlossen und für sieben Minuten in ein Ultraschallbad überführt, um die Bakterien von der Blattoberfläche zu lösen und zu desaggregieren (O'Brien & Lindow 1989).



Abb. 6: Blattrosetten von *A. thaliana* in Kaliumphosphatpuffer

Nach ca. 2 sec Vortexen wurden unter der Sterilbank die Blätter aus der Bakteriensuspension entfernt. Für die Kultivierungsversuche wurden diese Blattoberflächensuspensionen direkt verwendet. Ebenso wurde von solchen Suspensionen je 1ml für Gesamtzellquantifizierungen abgenommen.

Die restlichen Suspensionen wurde entweder für 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 2ml abgenommen und der Rest in 2ml Kunststoffreaktionsgefäße überführt, oder die Suspension ohne vorherige Zentrifugation auf 2 ml-Gefäße aufgeteilt. Diese wurden bei 13200 rpm

und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf geringe Mengen entfernt und der Rückstand in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Vorher aufgeteilte Proben wurden nun wieder zu einer Probe vereinigt. Die so gewonnenen Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.5.2 Kultivierung von Bakterien

Kultivierbare Bakterien auf A. thaliana Col-0

Die von den Blättern isolierten Bakterien klimaschrankkultivierter Pflanzen wurden auf sechs verschiedenen Medien kultiviert (siehe Anhang 7.3, Tab. H). Es handelte sich um drei verschiedene Vollmedien (LB, KB, M1), zwei Mineralmedien (MSM1 und MSM2) sowie ein Medium mit insgesamt reduziertem Nährstoffangebot (0,1xLB). Es sollten damit möglichst unterschiedliche Nährstoffzusammensetzungen und -konzentrationen angeboten werden um ein breites Spektrum von Bakterien zu erfassen (s. 4.2.1). Alle Medien wurden nach Zusammenstellung autoklaviert und nach Zugabe von 50-100 µg/ml sterilfiltriertem Cycloheximid in Dimethylsulfoxid-Lösung und gegebenenfalls weiterer hitzeempfindlicher Zusatzstoffe unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Ein kleinerer Kultivierungsansatz wurde mit Pflanzen nach Freilandwachstumsperiode durchgeführt. Hierbei wurde genauso verfahren, jedoch nur zwei Kulturmedium (0,1xLB und MSM3) verwendet.

Die Blattabwasch-Suspensionen wurden in der Regel 10^{-1} verdünnt mit je 100µl ausplattiert. Die Platten wurden bei Raumtemperatur für 4 Tage im Dunkeln inkubiert. Danach wurden unter sterilen Bedingungen unterschiedliche Morphotypen durch einen Verdünnungsausstrich auf frische Platten isoliert (Abb. 7). Nach erneutem Wachstum wurden die Isolate wie in 3.5.4 beschrieben für eine Identifizierung sequenziert. Zur Lagerung der Isolate wurden einzelne Kolonien der jeweiligen Stämme gepickt und in Flüssigkultur in dem gleichen Medium, das zu ihrer Isolierung verwendet wurde, angezogen. Von diesen Kulturen wurden jeweils 750µl mit 250µl sterilem Glycerin versetzt und über 4°C und -20°C Schritte für jeweils einige Stunden schließlich in die -80°C-Lagerung überführt. Isolate, die sich nicht in Flüssigkultur anziehen ließen wurden weiterhin auf Kulturplatten kultiviert und bei 4°C gelagert.

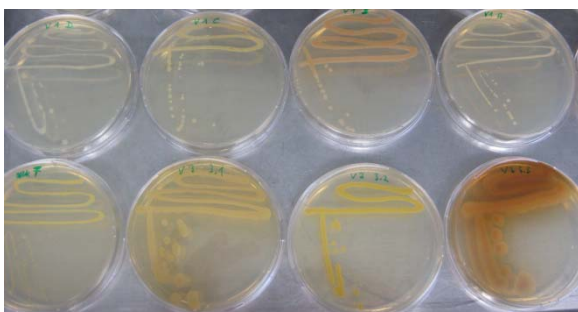


Abb. 7: Verdünnungsausstrich einiger Isolate.

Anreicherungskultivierung

Zur Isolierung von Bakterien mit der Fähigkeit, langkettige Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle zu nutzen, wurde eine Anreicherungskultivierung durchgeführt. Dazu wurde ein Mineralmedium (MSM3) als Flüssigmedium verwendet. In sterilen Glaskulturröhrchen wurden je 3ml 10% sterilfiltriertes, C₁₆-Alkan enthaltendes Medium mit je 50µl einer unverdünnten Blattabwasch-Suspension (s. 3.5.1) angeimpft. Nach sieben Wochen Inkubation unter Schütteln bei ca. 175 rpm und 30 °C wurden aus diesen Ansätzen wiederum 50µl entnommen und in einen neuen Kulturansatz überführt. Danach wurden Kulturplatten mit demselben Medium hergestellt und je 100µl der wiederum 7 Wochen geschüttelten Flüssigkulturen ausplattiert. Außerdem wurde ein Aliquot der Anreicherungskultur auf MSM4-Platten ausgestrichen, die C₂₂-Alkan statt C₁₆-Alkan als Kohlenstoffquelle enthielten. Nach einer Woche Inkubation bei 30 °C und weiteren 5 Wochen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die entstandenen Kolonien gepickt und überstrichen. Nach erfolgtem Wachstum wurden einige Isolate mit einem Binokular betrachtet und fotografisch dokumentiert. Zudem wurde mittels 16S rRNA-Gen Partialsequenzierung eine taxonomische Zuordnung der Isolate unternommen (s. 3.5.4).

3.5.3 Quantifizierung von Bakterien

Quantifizierung von Bakterien auf Blattoberflächen mittels cfu-Zählungen

Zum Zweck der Quantifizierung von Bakterien wurden pro untersuchter Pflanzenlinie und Pflanzenalter 3-4 Pflanzen untersucht. Von den jeweiligen Blattabwasch-Suspensionen (s. 3.5.1) wurden Verdünnungsreihen in Kaliumphosphatpuffer (0,1M, pH 7) bis 10⁻³ angefertigt und jeweils 100 µl der Verdünnungen auf jeweils drei Replikatplatten ausplattiert. Das hierbei verwendete Medium war 0,1xLB. Nach 5 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt und mit der Verdünnung der ausplattierten Suspension verrechnet. Weiterhin erfolgte eine Verrechnung mit der ursprünglich abgewaschenen Blattfläche, die wie in Abschnitt 3.3 für Wachsanalysen beschrieben ermittelt wurden.

Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels DAPI-Färbungen

Für eine Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 1ml-Proben der Blattabwasch-Suspensionen (s. 3.5.1) entnommen und durch Zugabe von 10% Formaldehyd-37%-Lösung (Endkonzentration in der Probe 3,7%) mindestens über Nacht fixiert. Daraufhin wurden die Proben mit 0,7µg ml⁻¹ DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) versetzt, für 30 min im Dunkeln inkubiert und durch 0,2µm Polykarbonatmembranen gefiltert oder ohne Färbung gefiltert. Dieses geschah in einer Glasapparatur unter Verwendung einer Vakuumpumpe. Die Filter wurden mit jeweils ca. 5ml steril filtriertem Wasser und 70%-Ethanol nachgespült. Danach wurden die Filter aus der Apparatur genommen und auf Glasobjektträger gelegt, wo sie mit Citifluor oder noch nicht gefärbte Proben mit einem Eindeckmittel, das DAPI enthielt (Roti® Mount FluorCare DAPI) und einem Deckglas eingedeckt wurden. Die Zählung aller leuchtenden Zellen erfolgte unter einem Zeiss Axiophot, einem Zeiss Observer.Z1 oder einem Leica DMR Epifluoreszenzmikroskop unter Zuhilfenahme eines 100X Ölimmersionsobjektivs, eines DAPI-Fluoreszenzfilters und eines Okulars mit Zählgitter einer definierten Größe. Je Probe wurde die Zählung 10 Mal auf unterschiedlichen Stellen des Filters durchgeführt.

Die erhaltenen Zählwerte je Zählgitter wurden auf die Gesamtfläche des Filters hochgerechnet und mit der Verdünnung der Probe verrechnet. Die Anzahl der Zellen je cm² Blattfläche wurde anhand der ermittelten Blattflächen der abgewaschenen Blätter errechnet. Die Flächengrößenbestimmung der analysierten Blätter erfolgte wie in Abschnitt 3.3 für die Blattflächen wachsextrahierter Blätter beschrieben. Für die statistische Analyse der erhaltenen Werte im Vergleich zwischen den untersuchten Pflanzenlinien wurde ein Student's T-Test verwendet. Dieser wurde mithilfe der Software STATISTICA durchgeführt.

3.5.4 Gewinnung von 16S SSU rRNA-Gensequenzen

Zur Identifizierung der isolierten Bakterienstämme wurde ein nahezu vollständiges Stück des bakteriellen 16S SSU rRNA-Gens amplifiziert. Dieses erfolgte in der Regel über eine PCR-Reaktion mit einem Lysat einer bakteriellen Kolonie (1 Kolonie in 30µl H₂O_{dest,ster} für 10 min bei 100°C und anschließend für 5 min bei 0 °C inkubiert) als Ausgangs-DNA.

PCR-Ansatz:

- 5µl Lysat
- 5µl PCR-Puffer (10x BioTherm)
- 1µl 10mM dNTPs
- Je 1µl 100µM forward und reverse Primer (27f/1492r, Lane 1991)
- 0,25µl = 1,25U SupraTherm™ Polymerase
- Ad 50µl H₂O_{dest,ster}

PCR-Bedingungen:

- 95 °C 2 min
 - 95 °C 30 sec
 - 54 °C 45 sec
 - 72°C 1,5 min
- } x 34

Das Resultat der PCRs wurde auf 2%igen Agarosegelen überprüft. Stämme, deren 16S rRNA Gen mittels Lysat-PCR nicht erfasst werden konnten, wurden in Flüssigkultur über Nacht bei 28-33°C und Schütteln bei 175 rpm angezogen, ihre chromosomale DNA mithilfe eines Kits (FastDNA®, innuPREP, QuickExtract™ Extraction Solution) oder eines Standardprotokolls (siehe 7.2.3) isoliert und die PCR mit 1µl der DNA-Lösung nochmals durchgeführt.

Die Amplifikate wurden mithilfe eines PCR-Aufreinigungs-Kits (NucleoSpin® oder PeqGold) nach den Angaben des Herstellers entweder aus dem Agarosegel oder aus dem PCR-Ansatz direkt aufgereinigt und die Proben einer Sequenzier-PCR unter Einsatz des BigDye® v1.1 Cycle Sequencing Kits unterzogen (PCR-Ansatz 1). Die Bakterienstämme, welche aus den Anreicherungskulturen isoliert worden waren, durchliefen die gleiche Vorgehensweise, wurden aber über einen im Volumen verringerten PCR-Ansatz (2) sequenziert.

PCR-Ansatz 1:

- 2µl PCR-Puffer (5x BigDye® Puffer)
- 2µl Ready Reaction Mix
- 1µl 25µM forward Primer (27f)
- 3µl PCR-Produkt-Lösung
- 2µl H₂O_{dest, ster}

PCR-Ansatz 2:

- 1µl PCR-Puffer (2,5x BigDye® Puffer)
- 1µl Ready Reaction Mix
- 1µl 5µM forward Primer (27f)
- 2µl PCR-Produkt-Lösung

PCR-Bedingungen:

- 95 °C 2 min
 - 95 °C 30 sec
 - 54 °C 30 sec
 - 60 °C 4 min
- } x 30

Die Sequenzierung wurde am Institut für Immunologie und Virologie der Universität Würzburg durchgeführt. PCR-Produkte die wiederholt keine verwertbare Sequenz ergaben, wurden von weiteren Untersuchungen ausgenommen. Alle Isolate wurden zunächst „ansequenziert“, was bedeutet, dass das PCR-Produkt nur von einer Seite sequenziert wurde, was aufgrund der nachlassenden Stärke der Sequenzier-PCR-Reaktion zu letztlich abbrechenden Sequenzen führt. In der Regel konnten etwa 300-500 bp dieser Anfangssequenzen für eine vorläufige Identifizierung verwendet werden.

Für diese Identifizierung wurden die Sequenzen unter Verwendung des online verfügbaren BLAST®-Algorithmus (Altschul et al. 1990) den nächstmöglich verwandten Sequenzen aus der GenBank-, EMBL-, DDBJ-, PDB- oder RefSeq-Datenbank zugeordnet. Dazu wurden die Sequenzen in die Onlinemaske des „nucleotide-BLAST“-Programms kopiert und gegen die „nucleotide collection (nr/nt)“-Datenbank verglichen. In der Regel wurden die Einträge mit der größten Ähnlichkeit zur Eingabesequenz als taxonomisch wahrscheinlichste Einordnung übernommen.

Zur genaueren phylogenetischen Einordnung und Erstellung eines phylogenetischen Baums wurden von einigen Isolaten annähernde Vollständigsequenzen des 16S-Gens erstellt. Dazu wurden die PCR-Produkte kloniert (s. 3.5.5). Die auf den Plasmiden enthaltenen Sequenzen wurden auf die gleiche Art und Weise sequenziert, dabei aber mehrere Reaktionen mit verschiedenen Primern (Sp6, T7, 341f) durchgeführt, die eine Abdeckung des gesamten PCR-Produkts gewährleisten.

3.5.5 Klonierung

Zur Klonierung von aufgereinigten PCR-Produkten wurden die Vektoren pGEM®-T Easy oder pJET1.2/blunt verwendet. Zunächst wurden die Amplifikate nach den Angaben des Herstellers in den Vektor ligiert. Es wurden in der Regel 3 µl der PCR-Produkt-Lösung für die Ligation verwendet. Die Inkubationszeit der Ansätze des pGEM®-T Easy Vektors wurde für ca. 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die mit dem pJET1.2/blunt Vektor durchgeführten Ligationen wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erfolgter Ligation wurden die Plasmide in hitzekompetente *Escherichia coli* NovaBlue-Zellen transformiert. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und auf 10-50µl-Aliquots aufgeteilt. Danach wurden jeweils 2µl Ligationsansatz hinzugegeben und für 30min

auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze für 1 min 15 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Darauf folgte sofort wieder eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Als Nächstes wurde den Ansätzen 450µl bis 1ml LB oder SOC-Medium zugegeben, die Ansätze 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und von allen Ansätzen 100µl direkt ausplattiert. Der Rest wurde für 5min bei 5000rpm abzentrifugiert, ein Teil des Überstands verworfen und der resuspendierte Rest der Suspension ebenfalls ausplattiert. Die Kulturplatten enthielten AIX- (pGEM®-T Easy) oder LB/Amp-Medium (pJET1.2/blunt) und wurden jeweils über Nacht bei 37°C inkubiert.

Danach erfolgte bei Verwendung des pGEM®-T Easy Vektors das Auswählen weißer Kolonien bei denen das Amplifikat-Insert das auf dem Plasmid vorhandene β-Galaktosidase-Gen inaktiviert hatte und die somit ein Insert enthalten sollten (bei blau wachsenden Kolonien war das *lacZ*-Gen auf dem Plasmid nicht zerstört, sie konnten das im Medium enthaltene Laktose-Analogon X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-Galaktopyranosid) spalten. Das dadurch frei werdende 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol dimerisiert und wird zu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo, dem blauen Farbstoff, oxidiert). Auf dem pJET1.2/blunt Plasmid wurde bei Nicht-Insertion eines PCR-Produkts ein letales Gen abgelesen, alle wachsenden Klone enthielten also ein Insert. Die Größe des Inserts, die auf seine Korrektheit schließen ließ, wurde durch eine Kolonie-PCR überprüft und die jeweiligen Klone auf eine frische Platte überstrichen und nummeriert:

PCR-Ansatz:

- 5µl PCR-Puffer (10x BioTherm)
- 1µl 10mM dNTPs
- Je 1µl 10 µM forward und reverse Primer (sp6/T7 oder pJET1.2 Forward/Reverse Primer)
- 0,25µl = 1,25U SupraTherm/ DreamTaq (pJET1.2)
- Ad 50µl H₂O_{dest, ster}
- 1 mit steriler Pipettenspitze gepickte Kolonie

PCR-Bedingungen (pGEM®-T Easy):

- 96°C 5 min
 - 96°C 30 sec
 - 45°C 30 sec
 - 72°C 1 min 30 sec
 - 72 °C 5 min
- } x29

PCR-Bedingungen (pJET1.2/blunt):

- 95°C 3 min
 - 95°C 15 sec
 - 60°C 15 sec
 - 72°C 1 min
 - 72°C 5 min
- } x29

Enthielten die Plasmide die Inserts gewünschter Länge wurden die entsprechenden Klone über Nacht in flüssigem LB/Amp-Medium angezogen und nachfolgend ihre Plasmide mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Sequenzierung der Inserts erfolgte wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben.

Für DGGE-Banden-Klonierungen, die dem Vergleich der bakteriellen Besiedelung des Ler-Wildtyps in den Jahren 2010 und 2011 entstammten und mit dem pJet1.2/blunt-Vektor durchgeführt worden waren, wurden die nach der Klonierung durchgeführten Kolonie-PCR-Produkte über das NucleoSpin® Gel&PCR Cleanup-Kit aufgereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung an die Firma LGC Genomics, Berlin geschickt.

3.5.6 Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE)

Vorbereitung und Durchführung der Gradienten-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der Proben für eine denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese wurde aus konzentrierten Blattabwasch-Suspensionen (s. 3.5.1) die bakterielle DNA in unterschiedlicher Weise zugänglich gemacht:

Proben von Phyllospärenbakterien von Col-0/g/1-Pflanzen, die unter kontrollierten Bedingungen angezogen worden waren, wurden bei 100 °C für 10 min und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Durch die thermische Lyse wurde die bakterielle DNA in den Proben zugänglich. Substratproben die zum Vergleich genommen wurden (ca. 0,2-0,5g Erde aus den Töpfen der analysierten Pflanzen), wurden mit dem FastDNA® Spin for Soil Kit nach den Vorgaben des Herstellers aufgearbeitet.

Proben von Pflanzen, die eine Freiland-Wachstumsperiode erfahren hatten, wurden wegen der erwarteten Verunreinigung der Proben durch Stäube oder andere möglicherweise PCR-hemmende Substanzen über ein Kit zur DNA-Isolierung (MasterPure™ Complete) für die DGGE-PCR vorbereitet.

Die erhaltene DNA wurde in eine „DGGE-PCR“ eingesetzt, die mit dem KAPA2G™ robust PCR-Kit durchgeführt wurde. Hierbei wurde mit den universellen Primern 341f+GC/907r ein, die variablen Regionen V3, V4 und V5 umfassender Abschnitt des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifiziert. Die Primer banden an konservierte Regionen dieses Gens und erfassten so theoretisch alle in der Probe enthaltenen Bakterientypen. Der Forward-Primer beinhaltet eine sogenannte „GC-clamp“, ein 40 bp langer Abschnitt, der ausschließlich aus den Basen G und C bestand und in der DGGE nicht denaturiert wird. Die Funktionalität der im KAPA2G™ robust PCR-Kit enthaltenen DNA-Polymerase war von Charge zu Charge unterschiedlich, weshalb die jeweiligen DGGE-PCR-Ansätze wiederholt optimiert werden mussten. Der PCR-Ansatz und die Bedingungen variierten daher geringfügig:

PCR-Ansatz:

- 8µl Bakterienlysat oder 1µl isolierte DNA
- 10 µl PCR-Puffer (5x PufferA)
- 1 µl 10mM dNTPs
- Je 1 µl 10-100µM forward und reverse Primer (341f+GC/907r)
- Optional: 1 µl 25mM MgCl₂
- Optional: 1-2 µl 10mM BSA (bovines Serumalbumin)
- 0,15-0,2 (= 0,75-1 u) µl KAPA2G™ robust Polymerase
- Ad 50µl H₂O_{dest, ster}

PCR-Bedingungen:

- 95 °C 2-2,5 min
 - 95 °C 30 sec
 - 54-56 °C 20 sec
 - 72°C 20-25 sec
- } x 34-36

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt und so der Erfolg der Amplifikation überprüft. Danach wurde der verbleibende Teil der erfolgreich verlaufenen Reaktionen auf ein vorbereitetes DGGE-Gel aufgetragen.

Polyacrylamid-Gele wurden jeweils am Vortag der geplanten DGGE vorbereitet: Dazu wurden zwei 10%ige Acrylamid-Lösungen benötigt, die über Formamid und Harnstoff DNA zu 0% oder zu 80% denaturierten. Von diesen Lösungen wurden jeweils 12,5 ml mit 40µl APS (Ammoniumperoxodisulfat) und 16µl Temed versetzt, um den Polymerisationsprozess in Gang zu setzen. Daraufhin wurden die Lösungen sofort in noch flüssiger Form zwischen zwei miteinander mit 0,75mm Zwischenraum verspannte und in einer Halterung befestigte Glasplatten gegossen. Dazu wurde ein Gradientengeißer verwendet, der die beiden Lösungen in unterschiedlichen Anteilen ineinander laufen ließ. Dadurch entstand der benötigte DNA-denaturierende chemische Gradient vom oberen Teil des Gels (0% Denaturierung) zum unteren Teil des Gels (80% Denaturierung). Abschließend wurden am oberen Rand des Gels noch Kämme eingefügt, die Taschen zum Beladen der Gele offenhielten.

Nachdem die über Nacht bei 4°C auspolymerisierten Gele in einer Halterung in ein vorgeheiztes (60°C) Laufpufferbecken (Laufpuffer 1xTAE) eingebracht worden waren, wurden die mit einem Gelladepuffer versetzten PCR-Reaktionen sowie ein für die DGGE entwickelter DNA-Marker in die Taschen pipettiert. Die über die DCode™ Apparatur angelegte Spannung (150-200V) zog die PCR-Produkte danach über 4,5-6h durch das Gel mit dem enthaltenen denaturierenden Gradienten. Die verschiedenen enthaltenen 16S-Gen-PCR-Produkte der zu vergleichenden mikrobiellen Gemeinschaften wurden dadurch nach ihren jeweiligen Denaturierungseigenschaften, die durch ihre Sequenz beeinflusst wurden, aufgetrennt. 16S-Genabschnitte, die z.B. einen höheren Gehalt der Basen A oder T in ihrer Sequenz hatten, wurde früher denaturiert und konnten sich danach nur noch sehr viel langsamer durch das Gel bewegen als andere Phylotypen. Die durch die PCR eingeführte GC-clamp am Primer verhinderte das vollständige Dissoziieren der DNA-Stränge und sorgte so für die Bildung der Banden. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele aus der Halterung genommen und in einer 0,00005%igen Ethidiumbromidlösung für ca. 20 min gefärbt. Danach konnten sie in einem Gel Doc XR-Gerät unter UV-Licht betrachtet werden.

Identifizierung bakterieller Phylotypen

Aus einigen Gelen wurden zur Identifizierung der bakteriellen Phylotypen Banden ausgeschnitten. Diese wurden einzeln in 0,2 oder 0,5ml Reaktionsgefäße überführt und in 25µl H₂O_{dest,ster} mindestens über Nacht bei 4°C eluiert. Danach wurde auf 4-5µl des Eluats eine Banden-PCR mit denselben Primern wie für die DGGE-PCR (jedoch ohne GC-clamp) durchgeführt. Auch hier waren je nach Polymerase-Charge (KAPA2G™ robust) Optimierungen nötig:

PCR-Ansatz:

- 4-5µl Eluat
- 10 µl PCR-Puffer (5x PufferA)
- 1 µl 10mM dNTPs
- Je 1 µl 10-100µM forward und reverse Primer (341f /907r, Muyzer et al. 1998)
- 0,5 µl 25mM MgCl₂
- Optional: 1 µl 10mM BSA (bovines Serumalbumin)
- 0,2 (=1 u) µl KAPA2G™ robust Polymerase
- Ad 50µl H₂O_{dest, ster}

PCR-Bedingungen:

- | | | |
|--|---|---------|
| <ul style="list-style-type: none"> - 95 °C 2-2,5 min - 95 °C 30 sec - 54-60 °C 20 sec - 72°C 20-25 sec | } | x 34-36 |
|--|---|---------|

Die entstandenen PCR-Produkte wurden mit einem Kit (NucleoSpin® oder PeqGold) aufgereinigt und kloniert (siehe 3.5.5).

Um aufzudecken, ob hinter einer Bande im DGGE-Bild möglicherweise mehr als ein bakterieller Phylotyp stand, wurden für klonierte DGGE-Banden aus der Col-0/*g/1*-Analyse mehrere Klone mit dem Insert gewünschter Länge einer RFLP-Analyse mit den Restriktionsenzymen *Hae*III und *Msp*I unterzogen. Dabei wurden jeweils Fast Digest® Enzyme verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und je universellem Restriktionsmuster 1 Klon, je Bande jedoch maximal 3 Klone, sequenziert. Dieses geschah mit den Primern Sp6 und T7, wie in Abschnitt 3.5.4 für PCR-Produkte aus kultivierbaren Bakterienisolaten beschrieben.

Beim Vergleich der bakteriellen Besiedelung des Ler-Wildtyps in den Jahren 2010 und 2011 wurde die Vorgehensweise dahingehend abgewandelt, dass von allen klonierten Banden grundsätzlich 3 Klone sequenziert wurden (s. 3.5.5).

Auswertung der Gelbilder

Die Bilder der DGGE-Gele wurden mit einer Bildauswertungssoftware (Quantity One® 1-D Analysis) analysiert. Mithilfe der Software konnten Marker-Spuren definiert und in den übrigen Spuren die Banden markiert und miteinander verglichen werden. Es erfolgte jeweils zuerst eine Definition der Spuren, die in die Analyse eingehen sollten, sowie gegebenenfalls die Definition der Marker-Spur als Standard, um mehrere Gele miteinander zu vergleichen. Danach wurden sichtbare Banden zunächst automatisch markiert und gegebenenfalls manuell nachkorrigiert. Als Letztes erfolgte ein ebenfalls automatisierter, aber manuelle Korrektur erfordernder Bandenvergleich. Damit wurde festgelegt, welche Banden auf gleicher Höhe liefen (Abb. 8). Mithilfe dieser Informationen konnten nun Clusteranalysen über An-/Abwesenheit der einzelnen Bandentypen in den analysierten Bandenmustern der verglichenen bakteriellen Gemeinschaften durchgeführt werden.

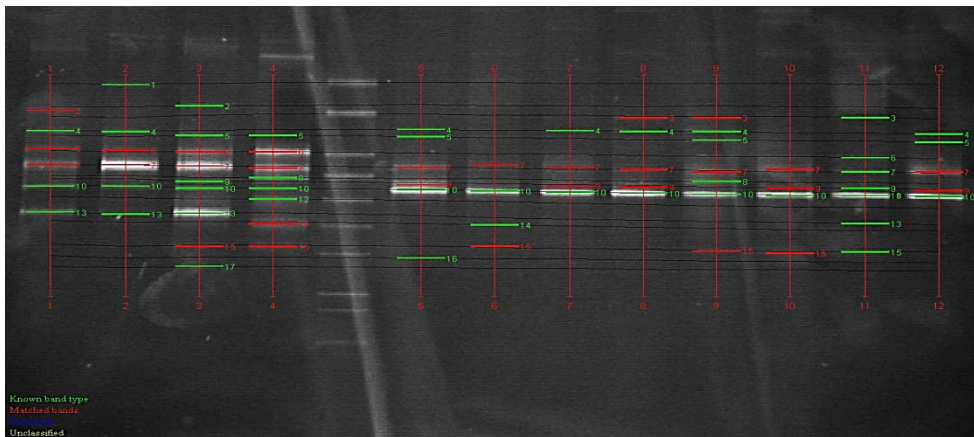


Abb. 8: Ansicht eines DGGE-Gels nach Quantity One®Analyse.

Für den Vergleich der bakteriellen Besiedelung von Arabidopsis Wachsmutanten, wurden mehrere Gele in eine Analyse einbezogen. Hierfür wurden Marker-Spuren und Wildtyp-Proben, die auf jedem der Gele mitgelaufen waren, zum Vergleichen der Gele herangezogen. Die binären Daten zur An-/Abwesenheit aller gefundenen Bandentypen wurden exportiert und mithilfe der PAST-Software (Hammer et al. 2001) eine nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS) und eine „Analysis of similarity“ (ANOSIM) durchgeführt. Für beides wurde das Jaccard-Ähnlichkeitsmaß verwendet.

3.5.7 Erstellung eines phylogenetischen Baums

16S-Gensequenzen ausgewählter bakterieller Isolate (s. 3.5.4 und 3.5.5) wurden mithilfe der ARB-Software (Ludwig et al. 2004) in einen phylogenetischen Baum eingerechnet. Dabei wurden die Sequenzen sowie Referenzsequenzen, die aus den besten BLAST-Hits (Altschul et al. 1990) zur jeweiligen Sequenz bestanden, an Sequenzen der Grunddatenbank, die diesem Baum zugrunde gelegt wurde (SILVA version93, Pruesse et al. 2007), aligniert. Daraufhin wurden diese Sequenzen mit der „maximum likelihood“-Methode und 1000 Wiederholungen eingerechnet. Einige Archaeensequenzen wurden dabei als Outgroup verwendet. Als nächstes wurden die zu vergleichenden Teilsequenzen aus den DGGE-Analysen (s. 3.5.6) sowie zugehörige Referenzsequenzen aligniert. Diese wurden, ohne die Topologie des Baums zu verändern, mithilfe des „parsimony interactive“-Werkzeugs hinzugefügt.

3.5.8 Amplicon-Pyrosequenzierung

Durchführung der Ampliconsequenzierung

Es wurden 15 DNA-Proben, die bereits mittels DGGE analysiert worden waren (s. 3.5.6), einer Amplicon-Pyrosequenzierung unterzogen. Dabei wird ein Profil von bakteriellen Gemeinschaften erstellt indem die Produkte einer PCR, die das 16S SSU rRNA Gen aller Bakterien der Gemeinschaft erfasst, nahezu vollständig sequenziert werden. Diese PCR-Produkte werden als so genannte „amplicon-library“ (Amplicon-Bibliothek) bezeichnet und wurden für jede der 15 Proben erstellt. Es wurde dabei für jede DNA-Probe ein eindeutig markierter forward-primer verwendet (siehe Anhang 7.4). Dabei handelte es sich um den 341f-Primer, der mit jeweils einem Multiplex-Code und dem für alle Proben gleichen „AdaptorA“, der später in der Sequenzierung benötigt wurde, versehen war. Der

Multiplex-Code ermöglichte nach einer gemeinsamen Sequenzierung der Amplicon-Bibliotheken die spätere Zuordnung der Sequenzen zu den Proben. Als reverse-Primer wurde für alle Proben der mit dem „AdaptorB“ versehene 907r-Primer verwendet. Es wurde hier also der gleiche Sequenzabschnitt wie für die DGGE-Analysen verwendet, der die variablen Regionen V3, V4 und V5 des bakteriellen 16S rRNA-Gens umfasste. Die Reaktionen wurden mit dem KAPAHiFi™ PCR Kit durchgeführt.

PCR-Ansatz:

- 1µl DNA-Probe
- 10µl 5xPCR-Puffer
- 1,5µl 10mM dNTPs
- Je 1,5 – 2µl 10µM forward/reverse Primer (siehe 7.4)
- 0,5µl (=0,5U) KAPAHiFi™ Polymerase
- Ad 50µl H₂O_{dest, ster}

PCR-Bedingungen:

- 98°C 2 min 30 sec
 - 98°C 20 sec
 - 56-60°C 20 sec
 - 72°C 20 sec
- } x29-38

Die Amplifikate wurden auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die PCR-Bedingungen wurden für jeden Primer angepasst, da sich zeigte, dass einige Primer, vermutlich bedingt durch ihre individuellen Multiplex-Codes, nicht vergleichbar effizient wie die anderen Primer amplifizierten. Durch die individuellen Optimierungen entstanden für jede Probe Amplifikate ungefähr der gleichen Intensität auf dem Agarosegel. Für jede Probe wurden 5-12 analoge PCR-Reaktionen zusammengeführt und gemeinsam mit dem NucleoSpin®-Kit nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt.

Nach der Aufreinigung erfolgte eine Kontrolle über LabChip Mikrofluid-Gelelektrophorese mit dem Experion™ System. Es wurde das „Experion™ DNA 1K Analysis Kit“ nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es sollten außer dem PCR-Produkt keine weiteren, kleineren DNA-Fragmente, wie z.B. Primer-Dimere in der Probe enthalten sein. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe eines NanoDrop-Photometers bestimmt. Pro Amplicon-Bibliothek wurden ungefähr 1µg Amplicon-DNA zum Sequenzieren an die Firma LGC Genomics in Berlin geschickt. Dort wurden die Proben äquimolar zusammengeführt, für die Sequenzierung vorbereitet und mit der FLX+ Sequenzierplattform auf einer ¼ Picotiterplatte sequenziert. Das FLX+-System ermöglichte tatsächliche Sequenzlängen von etwa 500 Basen wodurch nahezu der gesamte, vorher amplifizierte DNA-Abschnitt sequenziert wurde.

Auswertung der Sequenzdaten

Die von LGC Genomics nach erfolgter Sequenzierung erhaltenen Rohsequenzdaten waren bereits durch die einzelnen Multiplex-Identifizier-Sequenzabschnitte den jeweiligen Ursprungsproben zugeordnet. Die Daten bestanden aus insgesamt 18 Dateien (Abb.9).

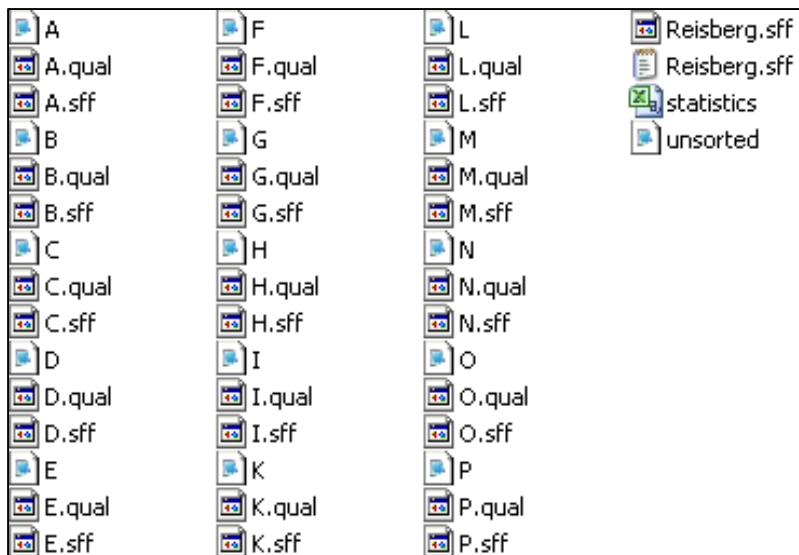


Abb. 9: Übersicht aus einem Dateiordner über alle von LGC Genomics erhaltenen Dateien der Ampliconsequenzierung. Die Buchstaben A bis P wurden zur Bezeichnung der Proben gewählt: Ler_1 bis Ler_3 = A,B,C, cer1_1 bis cer1_3 = D,E,F, cer6_1 bis cer6_3 = G,H,I, cer9_1 bis cer9_3 = K,L,M, cer16_1 bis cer16_3 = N,O,P.

Je Probe wurde eine .fasta-, eine .qual- und eine .sff-Datei geliefert. Zusätzlich entstand eine .fasta-Datei, die Sequenzen enthielt, die keinem Multiplex-Identifizierer zugeordnet werden konnten, eine .sff-Datei die alle Sequenzen vor der Sortierung enthielt und eine .sff.txt-Datei, die ebenfalls alle Sequenzen enthielt und zwei Dateiformate miteinander kombiniert. Weiterhin wurde eine .xls-Datei mitgeliefert, die eine Aufteilung der Rohsequenzanzahlen auf die einzelnen Proben enthielt.

Diese Sequenzdaten wurden mithilfe der Auswertungs-pipeline „QIIME v 1.4“ (Caporaso et al. 2010b) nach bestimmten Qualitätskriterien gefiltert. Es wurden dabei die zu Beginn des Jahres 2012 voreingestellten und empfohlenen Filterparameter verwendet. Dazu wurden die einzelnen .fasta-Dateien unter anderem anhand der Qualitätswertangaben in den zugehörigen .qual-Dateien durchsucht und nur Sequenzen im Datensatz belassen, die folgende Qualitätskriterien erfüllten:

- Sequenzlänge: ≥ 300 bp
- Anzahl undefinierter Basen (Ns): 0
- Qualitätswertangabe vorhanden
- Mittlerer Qualitätswert: > 25
- Maximale Homopolymerlänge: ≤ 6
- Anzahl nicht übereinstimmender Primerbasen: 0

Zusätzlich wurden Abschnitte schlechter Sequenzqualität am Anfang dieser Abschnitte abgeschnitten und nur im Datensatz belassen, wenn sie danach noch alle Qualitätskriterien erfüllten.

Nach diesen Schritten wurden die Daten, ebenfalls mithilfe eines Skripts (denoise_wrapper.py) aus der Auswertungs-pipeline QIIME, anhand der .sff-Dateien vorgeordnet und sortiert. Dieser Schritt wird empfohlen, da dadurch eine Überschätzung der Diversität durch Artefaktsequenzen reduziert wird (Huse et al. 2010, Quince et al. 2011, Bonder et al. 2012). Dabei entstanden Dateien die bereits vorläufige Sequenzcluster enthielten und Dateien die sogenannte „singletons“ also Sequenzen, die nur einmal im ganzen Datensatz gefunden wurden, enthielten. Alle Dateien aller 15 Proben wurden am Ende zu einer Gesamtdatei zusammengefasst. Diese wurde für die weiteren Schritte verwendet.

Als nächstes wurden aus den Daten „OTUs“ also operational taxonomic units auf 97%-Level gruppiert. Diese waren Cluster von Sequenzen, die sich zu 97% oder mehr ähnelten und daher als „gleicher“ Phylotyp angesehen wurden. Der Ähnlichkeitslevel wurde gewählt, da bekannt ist, dass bei höheren Levels (z.B. 99%) aufgrund der Kürze der Sequenzen bereits geringste Ungenauigkeiten der Sequenzierung dazu führen, dass Sequenzen in unterschiedliche OTUs geordnet werden. Das kann zu einer enormen Überschätzung der eigentlich in der Gemeinschaft vorliegenden bakteriellen Diversität führen (Kunin et al. 2010). Für die OTU-Gruppierung wurde ein Skript der pipeline verwendet, welches den UCLUST-Algorithmus (Edgar 2010) verwendete. Zu den OTUs wurden repräsentative Sequenzen ausgewählt, die für die einzelnen OTUs standen. Diese wurden daraufhin mithilfe des PyNAST-Algorithmus (Caporaso et al. 2010a) gegeneinander und gegen Referenzsequenzen ausgerichtet, sodass homologe Bereiche in allen Sequenzen an der gleichen Stelle auftraten („Alignment“). Dazu wurden sowohl der „Greengenes Core Datensatz“ (De Santis et al. 2006) als auch der „SILVA_r108 Core“ Datensatz (<http://www.arb-silva.de/>) als Referenz verwendet. Daraufhin wurden die Sequenzen mit dem ChimeraSlayer-Algorithmus (Haas et al. 2011) auf Chimären untersucht und durch weitere Filterschritte alle potentiellen Chimären und nicht ausrichtbare Sequenzen sowie Lücken im Alignment aussortiert. Auch hierfür wurden als Referenzdatensätze der Greengenes Core Datensatz und der SILVA_r108 Core Datensatz verwendet. Sequenzen, die mit nur einem der beiden Datensätze als Chimären gekennzeichnet wurden, wurden beibehalten und gesondert markiert oder von der Analyse ausgeschlossen (siehe Ergebnisteil für weitere Erläuterungen).

Daraufhin wurden die einzelnen OTUs einer putativen Taxonomie zugeordnet. Dieses geschah mithilfe des RDP-Classifer-Algorithmus (Wang et al. 2007) mit einer Konfidenzgrenze von 0.8 wiederum über den Vergleich der repräsentativen Sequenzen mit Referenzdatensätzen. Hierbei wurden ebenfalls die beiden oben genannten Datensätze verwendet. Der letzte Schritt der „primären“ Auswertung war das Zusammenfassen der Taxonomie der OTUs und der in die OTUs eingeordneten Sequenzanzahlen aus den jeweiligen Ursprungs-Proben in eine OTU-Tabelle.

Auf dieser Grundlage wurden Sequenzen ausgeschlossen, die sich nur ein einziges Mal im ganzen Datensatz fanden („singletons“), da es sich dabei oft um Sequenzierartefakte handelt (Behnke et al. 2011). Zudem wurden alle Sequenzen ausgeschlossen, die in diejenige OTU (Nr. 590) fielen, die taxonomisch Chloroplasten zugeordnet werden konnte. Dieser Datensatz diente, in unterschiedlich eingeschränkter Form, für die weiteren statistischen Betrachtungen und verschiedene Darstellungsformen. So wurde für statistische Berechnungen ein auf die Sequenzmenge der am wenigsten tief sequenzierten Probe (2340 Sequenzen) rarifizierter (unterbeprobter) Datensatz verwendet, um Effekte unterschiedlich tiefer Sequenzierung zu minimieren. Weiterhin wurde für die Darstellungen der konstanten bakteriellen Gemeinschaft der Datensatz auf die OTUs eingeschränkt, die ein bestimmtes Kriterium erfüllten: So mussten die OTUs die zur konstanten Gemeinschaft einer Pflanzenlinie gezählt wurden in allen drei Replikat-Proben der Linie auftreten. Für die statistischen Untersuchungen dieser Gemeinschaften wurden diese OTUs ebenfalls aus einem rarifizierten Datensatz entnommen. Für die Herausstellung der am meisten von der Pflanzenlinie beeinflussten OTUs (Abb. 44) wurden nur die „pflanzenlinienspezifisch“ gefundenen OTUs aus einem rarifizierten Datensatz entnommen und nur mit aufgenommen, wenn sie nach wie vor das Konstanzkriterium erfüllten und auch unter Verwendung beider Referenzdatensätze nicht als potenzielle Chimären eingestuft waren.

Für den statistischen Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien wurden NMDS (Nicht-metrische multidimensionale Skalierung) und ANOSIM („Analysis of Similarity“)-Analysen mithilfe der PAST-Software (Hammer et al. 2001) durchgeführt. Dabei wurde das Jaccard- oder das Kulczynski-Ähnlichkeitsmaß verwendet. Weiterhin wurde eine Clusteranalyse mit einem Skript aus der QIIME-pipeline durchgeführt, die auf UniFrac-Matrices basierend ein „average linkage“ clustering (UPGMA) mit 10 Wiederholungen erstellte. Außerdem wurde eine Clusteranalyse der nicht-rarifizierten, konstanten Gemeinschaften mit der „complete linkage“ und „binary“ Methode in R durchgeführt. Diversitäts- („diversity“), Äquitäts- („evenness“) und Vielfaltsindices („richness“) wurden mithilfe des ‚vegan‘-Pakets (Oksanen et al. 2012) in R berechnet. Für die Erstellung von Abb. 41 und der Venn-Diagramme wurde ebenfalls in R mit dem ‚gplots‘-Paket (Warnes et al. 2012) gearbeitet. Ein Mantel-Test, der die Ergebnisse der Wachsenanalysen der fünf Pflanzenlinien mit den bakteriellen Gemeinschaftsprofilen verglich, wurde mithilfe der PAST-Software durchgeführt. Hierbei wurde die euklidische Distanz für die Wachsprofile und der Jaccard-Index für die bakteriellen Gemeinschaften verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung kutikulärer Wachse

Die Pflanzenlinien wurden einer chemischen Analyse ihrer kutikulären Wachsschicht unterzogen. Dieses geschah für *A. thaliana* Col-0 und die *gl1*-Linie, um die Vergleichbarkeit der von Bakterien besiedelten Oberflächen zu untersuchen. Die Analyse der kutikulären Wachse der *A. thaliana cer*-Mutanten und des Ler-Wildtyps wurde durchgeführt, um den Wachs-Phänotyp der ausgewählten Mutanten unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen zu bestätigen. Für alle Analysen wurden kutikuläre Wachsextrakte durch Tauchen von Blättern in Chloroform hergestellt und mittels Gaschromatographie quantitativ und qualitativ untersucht (siehe Abschnitt 3.3). Die Pflanzen wurden jeweils so angezogen, wie es auch für den überwiegenden Teil der entsprechenden Mikrobiomanalysen geschah. So wurden für den Vergleich der *gl1*-Mutante mit dem Wildtyp Col-0 klimaschrankangezogene Pflanzen verwendet, da die bakterielle Besiedelung der beiden Pflanzenlinien an in dieser Art angezogenen Pflanzen am intensivsten analysiert wurde. Für den Vergleich der *cer*-Mutanten mit dem Ler-Wildtyp wurden Pflanzen verwendet, die eine vierwöchige Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten.

4.1.1 Wachse von *A. thaliana* Col-0- und *gl1*-Pflanzen

Es wurden 10 Wochen alte Pflanzen der *A. thaliana*-Linien Col-0 (Wildtyp) und *gl1* (nahezu trichomfreie Mutante), die im Klimaschrank angezogen worden waren, analysiert. Die Analysen wurden mit 4 Replikaten, also 4 Pflanzenindividuen pro Linie durchgeführt, wobei jeweils die Rosettenblätter einer Pflanze (27 – 56 cm² Blattfläche insgesamt je Probe) extrahiert wurden. Es ergab sich eine Gesamtwachsmenge von $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche in den kutikulären Wachsextrakten der Wildtyppflanzen und $1,0 \pm 0,2 \mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche in den *gl1*-Extrakten. Es konnten nur geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Wachsextrakte der beiden Pflanzenlinien gefunden werden (Abb. 10). Auf beiden Linien wurden Fettsäuren, Alkane, Alkohole, Sterole und weitere, nicht identifizierbare Komponenten nachgewiesen.

Hauptbestandteil der kutikulären Wachsextrakte beider Pflanzenlinien waren langkettige Alkohole ($0,38 \pm 0,08 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Col-0) und $0,38 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*gl1*)) und Fettsäuren ($0,32 \pm 0,13 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Col-0) und $0,29 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*gl1*)). Diese, ebenso wie in geringeren Mengen nachgewiesene Sterole ($0,12 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ auf Col-0 und $0,11 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ auf *gl1*), fanden sich in ähnlich großen Mengen auf den beiden Pflanzenlinien. Weiterhin zählten Alkane zu den Hauptkomponenten. Hier wurden in den Wildtyp-Extrakten $0,26 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ und in den *gl1*-Extrakten $0,11 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ Gesamtmenge an Alkanen festgestellt. Diese Unterschiede waren in Bezug auf die gesamte Stoffklasse signifikant (Student's T-Test, $p = 0,049$). $0,22 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Col-0) sowie $0,15 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*gl1*) der Gesamtwachsextrakte setzten sich aus nicht identifizierbaren Komponenten zusammen.

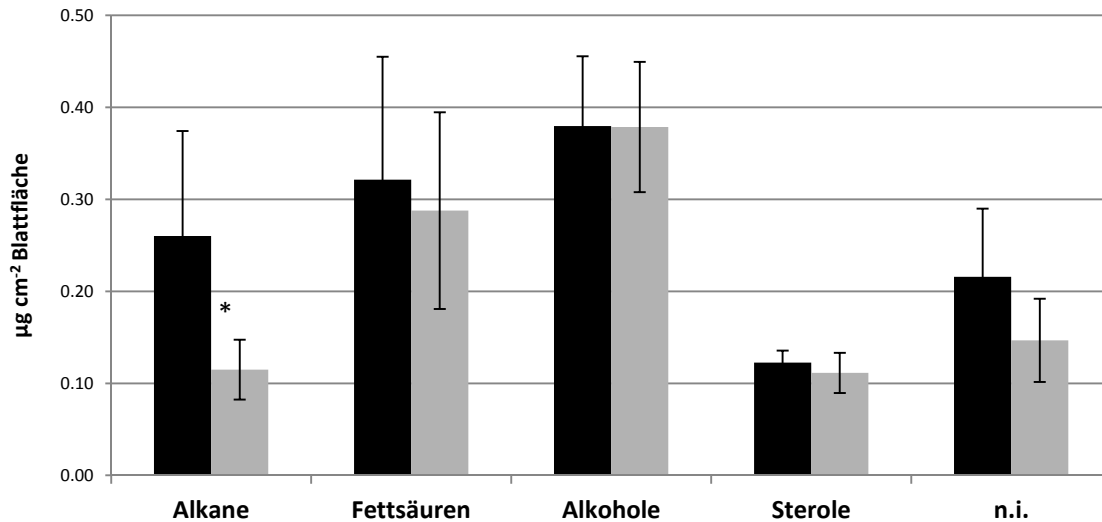


Abb. 10: Zusammensetzung der kutikulären Wachsextrakte von *A. thaliana* Col-0 (schwarz) und der *g/1*-Mutante (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Stoffklassen (je $n = 4 \pm \text{SD}$). „n.i.“ = nicht identifiziert. Ein signifikanter Unterschied in den Wachsmengen zwischen den beiden Pflanzenlinien ist mit * gekennzeichnet (Student's T-Test, $p = 0,049$).

In der Stoffklasse der Alkohole dominierten hinsichtlich der Kettenlänge in den epikutikulären Wachsextrakten beider Linien vor allem C_{30} - und C_{32} -Alkohol (Abb. 12). Beim Col-0 Wildtyp wurden hier $0,08 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ C_{30} -Alkohol und $0,2 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ C_{32} -Alkohol nachgewiesen. Die *g/1*-Extrakte enthielten ebenfalls $0,08 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ C_{30} -Alkohol und $0,2 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ C_{32} -Alkohol. Dabei ist zu betonen, dass für alle Alkohole der Kettenlänge C_{30} - C_{34} jeweils zwei deutlich getrennte Peaks in den Chromatogrammen vorlagen, die jedoch ein jeweils identisches Massenspektrum aufwiesen. Vermutlich handelte es sich dabei um Isoformen der jeweiligen Alkohole, die wahrscheinlich verzweigte Kohlenstoffketten aufweisen (persönliche Mitteilung Michael Riedel, Abb. 11). Deshalb wurden in Abbildung 12 die Alkoholkomponenten gleicher Kettenlänge zusammengefasst. Hinsichtlich aller Alkoholkomponenten in den kutikulären Wachsextrakten konnten keine signifikanten Mengenunterschiede zwischen Col-0 und der *g/1*-Mutante festgestellt werden.

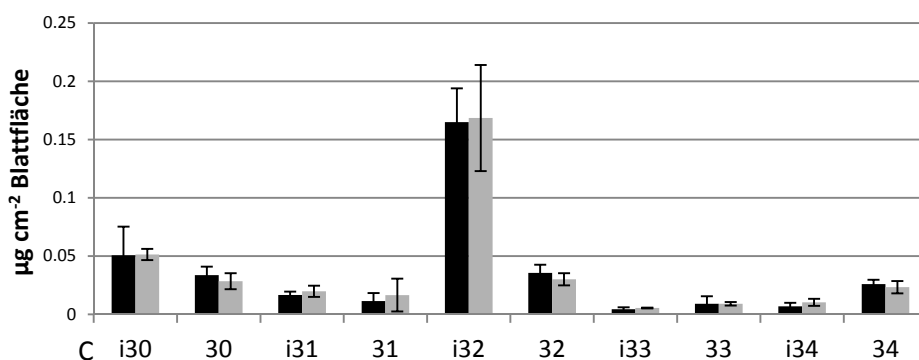


Abb. 11: Aufgliederung der C_{30} - C_{34} Alkohole in den kutikulären Wachsextrakten von *A. thaliana* Col-0 (schwarz) und der *g/1*-Mutante (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Komponenten (je $n = 4 \pm \text{SD}$). Ein „i“ vor der jeweiligen Kettenlängenangabe indiziert die Isoform des betreffenden Alkohols.

Freie Fettsäuren waren auf beiden Pflanzenlinien mit den Kettenlängen C_{24} , C_{26} und C_{28} bis C_{36} vertreten. Quantitativ wurden die größten Mengen an Fettsäuren der Kettenlängen C_{32} und C_{34} detektiert (Abb. 12). So traten in allen Wachsextrakten $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Col-0) bzw. $0,06 \pm 0,03 \mu\text{g}$

$\text{cm}^{-2}(\text{g/l})$ C_{32} -Säure auf und $0,10 \pm 0,06 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Col-0) bzw. $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ (g/l) C_{34} -Säure. Bei keiner der gefundenen Fettsäuren wurden statistisch signifikante Mengenunterschiede zwischen den Pflanzenlinien festgestellt.

Alkane waren mit Molekülen der Kettenlängen 27, 29, 30, 31, 32 und 33 vertreten (Abb. 12). Bezogen auf die Einzelkomponenten wurde bei C_{33} -Alkan eine statistisch signifikant (Student's-T-Test, $p = 0,0032$) geringere Menge der Substanz in der g/l-Mutante im Vergleich zum Col-0 Wildtyp gefunden. So wurde in den Col-0 Wachsextrakten $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ C_{33} -Alkan gefunden. In den g/l-Extrakten belief sich die Menge der Komponente auf lediglich $0,02 \pm 0,002 \mu\text{g cm}^{-2}$.

Cholesterol, Campesterol und Sitosterol waren außerdem in allen Wachsextrakten deutlich nachweisbar (Abb. 12). Die drei Sterole traten in ähnlich großen Mengen (um $0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$) auf beiden Pflanzenlinien auf. Bei einigen der „unbekannten Komponenten“ deuteten die Massenspektren auf eine Identifizierung als Aldehyde oder Alkylester hin. Diese traten jedoch nur in geringen Mengen auf und es konnte aufgrund zu geringer Konzentration keine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden.

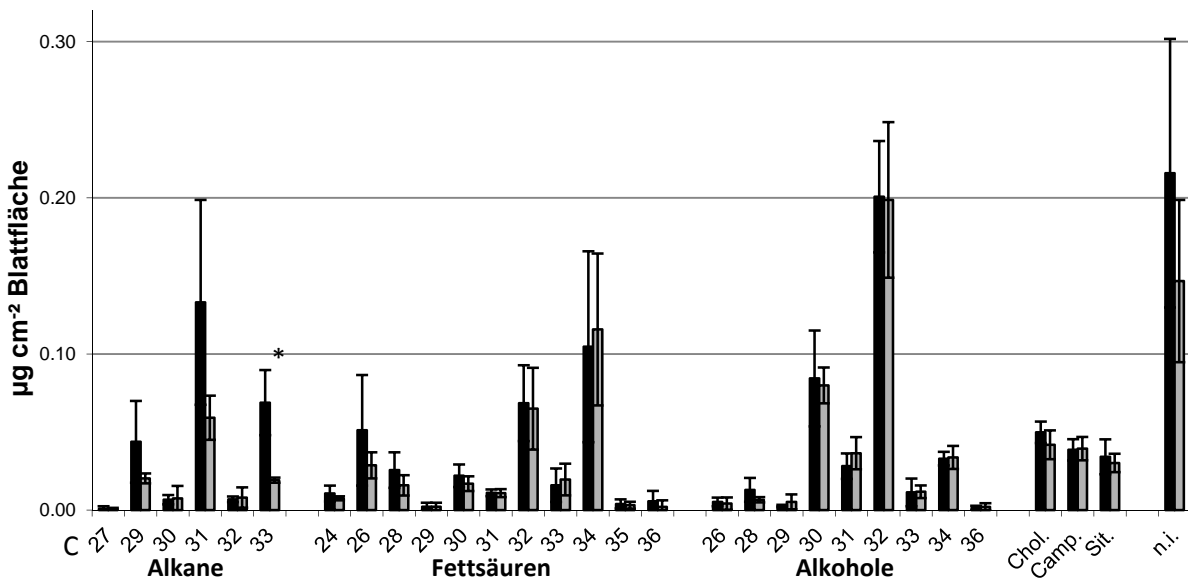


Abb. 12: Kettenlängenverteilung in den Stoffklassen, die in den kutikulären Wachsextrakten von *A. thaliana* Col-0 (schwarz) und der g/l-Mutante (grau) nachgewiesen wurden. Chol. = Cholesterol, Camp. = Campesterol, Sit. = Sitosterol und n.i. = unbekannt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Komponenten (je $n = 4 \pm \text{SD}$) in $\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche. Die mit „*“ markierte Komponente wies statistisch signifikante ($p = 0,0032$) Mengenunterschiede zwischen der Wildtyp und der g/l-Mutante auf (Student's T-Test).

4.1.2 Wachse von *A. thaliana* Ler und *cer*-Mutanten

Für die Analyse des *A. thaliana* Ler Wildtyps und der ausgewählten *eceriferum* Mutanten wurden 13 Wochen alte Pflanzen verwendet, die eine vierwöchige Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten. Die Analysen wurden jeweils mit 3 Replikatproben pro Pflanzenlinie durchgeführt. Für jede Probe wurden Rosettenblätter von 1-3 Pflanzen extrahiert um eine Blattanzahl von 10-20 Blättern pro Probe zu erreichen. Die extrahierte Blattfläche betrug jeweils zwischen 52 und 81 cm^2 . Die

festgestellte Gesamtwachsmenge in jeder Probe variierte stark zwischen den Pflanzenlinien (Tab. 1). So wurden in den Wildtypextrakten $4,49 \pm 0,35 \mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche gefunden, wohingegen von der *cer1*-Mutante eine nur etwa halb so große Gesamtwachsmenge extrahiert wurde. Auch die Gesamtwachsmengen, die von *cer6*-, *cer9*- und *cer16*-Pflanzen extrahiert wurden, waren geringer als die des Wildtyps.

Tab. 1: Gesamtwachsmenge in kutikulären Wachsextrakten von *A. thaliana* Ler, *cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16*. Dargestellt sind die Mittelwerte der in den Extrakten gefundenen Gesamtwachsmengen in $\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche (je $n = 3 \pm \text{SD}$). Alle in den *cer*-Linien-Extrakten gemessenen Gesamtwachsmengen sind signifikant niedriger als in den Wildtyp-Extrakten (Student's T-Test, $p = 0.000003$ (*cer1*), 0.005198 (*cer6*), 0.000690 (*cer9*), 0.020206 (*cer16*)).

Ler	<i>cer1</i>	<i>cer6</i>	<i>cer9</i>	<i>cer16</i>	Wachsmenge [$\mu\text{g cm}^{-2}$]
4.49 ± 0.35	2.28 ± 0.06	2.55 ± 0.60	3.34 ± 0.19	3.38 ± 0.51	

Bezüglich der identifizierten Haupt-Stoffklassen in den kutikulären Wachsextrakten ähnelten sich diese lediglich qualitativ (Abb. 13). So wurden auf allen Pflanzenlinien Alkane, Fettsäuren, Aldehyde, Alkylester und Alkohole gefunden. Diese waren jedoch in meist signifikant unterschiedlichen Mengen auf den jeweiligen Linien vertreten.

Bezüglich der identifizierten Haupt-Stoffklassen in den kutikulären Wachsextrakten ähnelten sich diese lediglich qualitativ (Abb. 13). So wurden auf allen Pflanzenlinien Alkane, Fettsäuren, Aldehyde, Alkylester und Alkohole gefunden. Diese waren jedoch in meist signifikant unterschiedlichen Mengen auf den jeweiligen Linien vertreten.

Im Vergleich der Pflanzenlinien bezüglich der Alkane fiel auf, dass alle *cer*-Linien geringere Mengen aufwiesen als der Wildtyp (Abb. 13). So wurden in den Ler-Wachsextrakten $2,33 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ nachgewiesen, in den Extrakten von *cer6* und *cer16* jedoch nur $0,97 \pm 0,25 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer6*) und $1,71 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer16*). Auf diesen drei Pflanzenlinien waren die Alkane die mengenmäßig am stärksten vertretene Stoffklasse. Die Linien *cer1* und *cer9* wiesen mit nur $0,48 \pm 0,21 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*) und $0,45 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer9*) die geringsten Alkanmengen auf. Auf diesen Pflanzenlinien traten die Alkane in der Mengenverteilung an die zweite Stelle hinter den freien Fettsäuren zurück.

In den Wachsextrakten der Linien *cer1* und *cer9* waren freie Fettsäuren mit $1,08 \pm 0,22 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*) und $1,61 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer9*) dominierend (Abb. 13). Im absoluten Vergleich weist jedoch nur die *cer9*-Linie den höchsten Gehalt an freien Fettsäuren auf. Die *cer1*-Mutante tritt, ebenso wie die *cer16* Mutante mit $0,91 \pm 0,27 \mu\text{g cm}^{-2}$, hinter dem Wildtyp mit $1,25 \pm 0,10 \mu\text{g cm}^{-2}$ zurück. Die geringsten Gehalte an freien Fettsäuren wurden in den Wachsextrakten der Pflanzenlinie *cer6* mit $0,51 \pm 0,17 \mu\text{g cm}^{-2}$ gefunden.

An dritte und vierte Stelle im Mengenvergleich der Stoffklassen traten in den Wachsextrakten aller Pflanzenlinien Alkylester und Alkohole (Abb. 13). Hier fiel auf, dass die Extrakte der Linien *cer6* und *cer9* mit $0,44 \pm 0,14 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer6*) und $0,43 \pm 0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer9*) die größten Mengen an Alkylestern enthielten. Diese waren etwa doppelt so hoch, wie die des Wildtyps ($0,26 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$). *Cer1* und *cer16* wiesen mit $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*) und $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer16*) nochmals deutlich niedrigere Ester-mengen als der Wildtyp auf. Hinsichtlich der Alkohole war zu beobachten, dass diese in den kutikulären Wachsextrakten der Linien Ler, *cer1* und *cer6* in annähernd gleichen Mengen auftraten ($0,37 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Ler), $0,35 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*) und $0,37 \pm 0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer6*)). Die *cer16*-Extrakte enthielten nur geringfügig kleinere Mengen an Alkoholen ($0,30 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$). Auf der

cer9 Mutante hingegen konnte mit $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ nur etwa ein Fünftel der Alkoholmenge des Wildtyps nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden Aldehyde in den Wachsextrakten von Ler und *cer16* in vergleichsweise geringen Mengen gefunden (Abb. 13). Trotzdem waren in den Extrakten der *cer16* Mutante etwa dreimal so große Mengen ($0,03 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$) an Aldehyden zu finden, wie in den Wildtyp-Extrakten ($0,01 \pm 0,002 \mu\text{g cm}^{-2}$). Auf der Linie *cer9* konnten keine Aldehyde nachgewiesen werden.

Außerdem wurden in den Wachsextrakten Sterole (Cholesterol, Sitosterol, Campesterol), Nonacosanon und C_{29} -sekundärer Alkohol mit der zweiten Hydroxylgruppe an C_{14} oder C_{15} sowie Komponenten detektiert, deren Massenspektren an Triterpenoide erinnerten, die jedoch nicht eindeutig als solche identifiziert werden konnten. Diese Substanzen waren in den Extrakten aller Pflanzenlinien in zumeist geringen Mengen ($> 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$) vertreten. Einige, der in den Chromatogrammen auftretenden Peaks, konnten zwar eindeutig identifiziert, aufgrund einer Überlagerung miteinander aber nicht genau quantifiziert werden. Diese Stoffklassen wurden daher, auch der Übersichtlichkeit halber, unter „Anderes“ zusammengefasst (Abb.13). Eine Ausnahme bildete eine Substanzklasse, die ausschließlich in den Wachsextrakten der *cer9*-Linie identifiziert wurde, hier jedoch in vergleichsweise großen Mengen auftrat ($0,18 \pm 0,06 \mu\text{g cm}^{-2}$) und somit die Hälfte der hier in „Anderes“ eingeordneten Stoffe ausmachte. Diese Substanzklasse wurde anhand ihrer Massenspektren vorläufig als Monoacylglycerole identifiziert (Curstedt 1974).

Nicht identifizierbare Substanzen waren zu etwa 5% in den Extrakten fast aller Pflanzenlinien vorhanden ($0,15 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Ler), $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*), $0,17 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer6*), $0,15 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer16*)) (Abb. 13). Auf der Pflanzenlinie *cer9* jedoch belief sich dieser Anteil auf über 12% ($0,41 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$). Verantwortlich dafür war vor allem eine weitere Stoffklasse, die aber nicht identifiziert werden konnte.

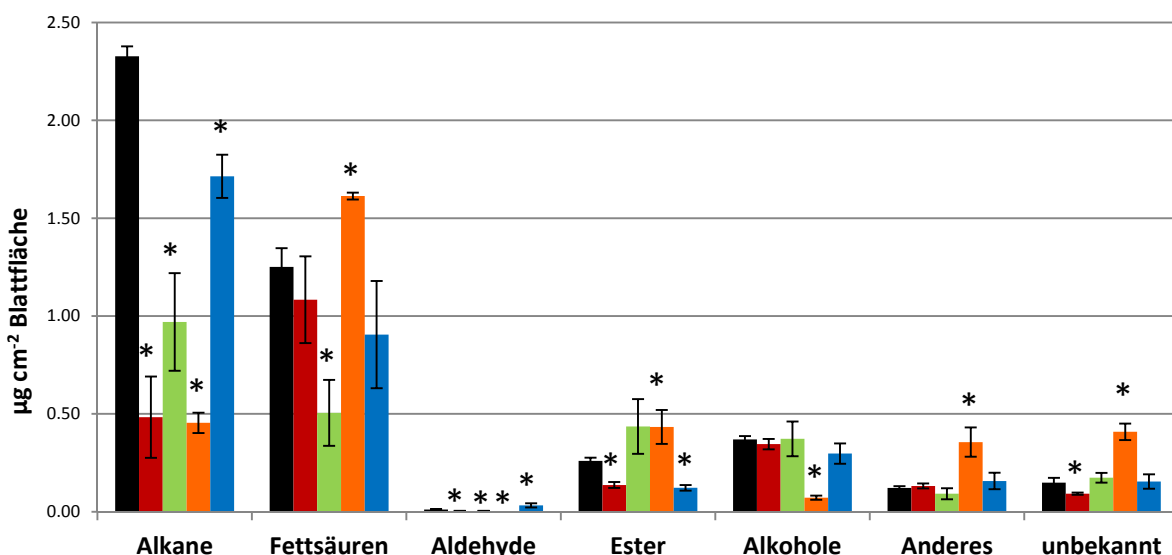


Abb. 13: Zusammensetzung der kutikulären Wachsextrakte von *A. thaliana* Ler (schwarz) sowie der *cer1* (rot), *cer6* (grün), *cer9* (orange) und *cer16* (blau) Mutanten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Stoffklassen (je $n = 3 \pm \text{SD}$) in $\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche. Signifikante Mengenunterschiede der in den kutikulären Wachsextrakten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind mit * gekennzeichnet (Student's T-Test). Die zugehörigen p-Werte sind Tabelle K unter 7.5 im Anhang zu entnehmen.

Hinsichtlich der Kettenlängenverteilung der einzelnen Komponenten gab es zwischen den fünf untersuchten Pflanzenlinien ebenfalls auffällige Unterschiede (Abb. 14, Abb. 15). Statistische Unterschiede (Student's T-Test) im Mengenvergleich der Einzelsubstanzen zwischen den kutikulären Wachsextrakten der *cer*-Linien im Vergleich zum Wildtyp sind in den Abbildungen gekennzeichnet.

In der Stoffklasse der Alkane (Abb. 14) war das C₃₁-Alkan auf allen Pflanzenlinien dominierend ($1,28 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Ler), $0,25 \pm 0,12 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer1*), $0,42 \pm 0,13 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer6*), $0,22 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer9*) und $0,91 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ (*cer16*)). An zweiter und dritter Stelle waren das C₂₉- und das C₃₃-Alkan in allen Extrakten enthalten. Im Vergleich zum Wildtyp waren jedoch in den Extrakten der *cer*-Linien geringere Mengen dieser Alkane zu finden. Die geringsten Mengen wurden in den Extrakten der *cer1* und der *cer9*-Mutante nachgewiesen. C₂₃-, C₂₅-, C₂₆-, C₂₇-, C₂₈-, C₃₀- und C₃₂-Alkan waren in Mengen von $\leq 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ vorhanden. Die Mengenverhältnisse zwischen den einzelnen Alkan-Komponenten waren also in den Extrakten aller Pflanzenlinien ähnlich, es differierten lediglich die absoluten Mengen.

In der Stoffklasse der Fettsäuren (Abb. 14) konnten größere Unterschiede beobachtet werden. So fand sich in den kutikulären Wachsextrakten der Pflanzenlinien Ler, *cer1* und *cer16* eine klare Mengendominanz der Fettsäuren mit den Kettenlängen C₃₂ und C₃₄. Wiederum wiesen die Extrakte des Ler-Wildtyps mit $0,46 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ die größte Menge an C₃₄-Fettsäure gegenüber der *cer1*- ($0,41 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$) und der *cer16*-Mutante ($0,35 \pm 0,11 \mu\text{g cm}^{-2}$) auf. Hinsichtlich der C₃₂-Fettsäure lagen *cer1* und Wildtyp mit $0,34 \pm 0,03$ bzw. $0,10 \mu\text{g cm}^{-2}$ in etwa gleichauf. Die Gehalte dieser Fettsäure in den Extrakten der *cer16*-Mutante betragen $0,25 \pm 0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$. Wesentlich andere Mengenverhältnisse zwischen den unterschiedlich langen Fettsäuren zeigten sich in der *cer6*- und der *cer9*-Mutante. Die Extrakte der *cer6*-Linie enthielten mit $0,09 \pm 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₃₂) und $0,06 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₃₄) die geringsten Mengen an C₃₂- und C₃₄-Fettsäure im Vergleich zu den anderen Pflanzenlinien. Diese geringen Mengen wurden auch von keiner anderen Fettsäure kompensiert. In den kutikulären Wachsextrakten der *cer9*-Linie hingegen wurden zwar ebenfalls mit $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₃₂) und $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₃₄) nur geringe Mengen C₃₂- und C₃₄-Fettsäure gefunden. Jedoch war auf dieser Pflanzenlinie ein enormer Anstieg der Mengen von C₂₄-, C₂₆- und C₂₈-Fettsäure, also ein Anstieg der kürzerkettigen Fettsäuren zu verzeichnen. Die hauptsächlich vertretene Fettsäure in den *cer9*-Extrakten war mit $0,59 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ die C₂₆-Fettsäure. Die C₂₄- und C₂₈-Säure wurden hier mit $0,30 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₂₄) und $0,25 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C₂₈) in ebenfalls vergleichsweise großen Mengen nachgewiesen. Vor allem in der *cer9*-Mutante traten bei einigen Fettsäuren wiederum zwei getrennte, kurz aufeinander folgende Peaks mit identischen Massenspektren auf. Diese wurden auch hier (siehe auch 4.1.1) als Isoformen mit vermutlich verzweigter Alkylkette interpretiert. Diese Isoformen wurden in den Extrakten der *cer16*-Mutante nicht nachgewiesen.

Aldehyde (Abb. 14) waren in den kutikulären Wachsextrakten aller Pflanzenlinien in nur sehr geringen Mengen oder gar nicht (*cer9*) vorhanden. Der C₂₈-Aldehyd wurde auf dem Wildtyp sowie auf der *cer16*-Mutante mit $0,01 \pm 0,003 \mu\text{g cm}^{-2}$ detektiert. Der C₃₀-Aldehyd konnte in den Extrakten keiner Pflanzenlinie außer der *cer16* ($0,01 \pm 0,003 \mu\text{g cm}^{-2}$) nachgewiesen werden. Der C₃₂-Aldehyd war auf den Linien Ler, *cer1* und *cer6* in Spuren um $0,001 \mu\text{g cm}^{-2}$ nachweisbar, lediglich auf der *cer16*-Mutante wurden $0,01 \pm 0,004 \mu\text{g cm}^{-2}$ gefunden. Der C₃₄-Aldehyd fand sich in den Extrakten des Wildtyps und der *cer16*-Mutante in ähnlichen Mengen ($0,003 \pm 0,001 \mu\text{g cm}^{-2}$), in den Extrakten der *cer6*- und der *cer1*-Linie konnte dieser Aldehyd gar nicht (*cer6*) oder nur in Spuren nachgewiesen werden.

In den Extrakten aller Pflanzenlinien waren weiterhin Alkylester zu finden (Abb. 15). Diese bestanden für jede gefundene Gesamtkettenlänge aus unterschiedlichen Kombinationen von Fettsäuren und Alkoholen, die sich anhand der Massenspektren nicht eindeutig determinieren ließen. Daher sind Ester-Komponenten nur mit ihrer jeweiligen Gesamtkettenlänge, die in den Analysen von C36 bis C58 reichte, bezeichnet. Da die Aufzeichnung der Massenspektren im verwendeten Gerät bei m/z 750 endete, konnten Ester ab C_{52} nur noch anhand des Abstands ihrer Peaks im Chromatogramm und der kürzeren Fragmente am Anfang ihrer Massenspektren zugeordnet werden, die sie als Ester identifizierten. Daher sind diese Komponenten in Abbildung 15 mit einem „*“ vor der Kettenlänge gekennzeichnet. In den größten Mengen gefundene Esterkomponenten waren in der Regel die C_{42} -, C_{44} -, C_{46} -, C_{48} -, C_{50} -, C_{52} -, C_{54} - und C_{56} -Ester. Beim Wildtyp waren C_{42} - und C_{44} -Ester mit jeweils $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$ in den größten Mengen vertreten. Geringere Mengen dieser Esterkomponenten wurden in den Extrakten der Linien *cer1* und *cer16* gefunden (auf beiden Linien je $0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{42}), $0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{44})). In den Extrakten dieser beiden Pflanzenlinien wurden auch von keiner anderen Esterkomponente größere Mengen detektiert. Die Extrakte der *cer6* und der *cer9*-Linie enthielten die größten Mengen an Estern. Auf der *cer6*-Linie traten vor allem auf C_{52} - ($0,08 \pm 0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$) und C_{42} -Ester ($0,05 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$) in größeren Mengen auf. Auf der *cer9*-Linie wurden keine Ester der Kettenlängen C36-C43 gefunden. Die größten Mengen der hier nachgewiesenen Ester wurden den Kettenlängen C52 ($0,07 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$) und C54 ($0,06 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$) zugeordnet. Zudem wurden in den kutikulären Wachsextrakten der Pflanzenlinien *Ler*, *cer1*, *cer6* und *cer9* ab den C_{44} -Estern bei allen geradzahligen Esterkomponenten und den C_{50} -Estern ebenfalls jeweils zwei getrennte Peaks mit nahezu identischen Massenspektren gefunden. Diese wurden auch in diesem Fall (siehe 4.1.1 und oben) als durch verzweigte Isoformen der Alkohole zustande gekommene „Iso-Ester“ interpretiert. Auffällig ist hierbei, dass auch diese Isoformen in den Extrakten der *cer16*-Linie gänzlich fehlten.

Alkylalkohole waren weitere Hauptkomponenten in den kutikulären Wachsextrakten der vier untersuchten *cer*-Linien und des *Ler*-Wildtyps (Abb. 15). Sie traten in Kettenlängen von C22 bis C34 auf. Auffällig war hier ebenfalls das Auftreten oben beschriebener Isoformen der Alkohole ab einer Kettenlänge von C28. Die größten Mengen an Alkoholen waren in den Wachsextrakten vor allem von C_{26} -, C_{28} -, C_{30} - und C_{32} -Alkoholen nachweisbar. In den Wildtyp-Extrakten wurden hierbei $0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{28}), $0,04 + 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($iC_{30} + C_{30}$), $0,06 + 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($iC_{32} + C_{32}$) sowie $0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{26}) gefunden. Mit $0,06 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{28}), $0,06 + 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($iC_{30} + C_{30}$), $0,06 + 0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($iC_{32} + C_{32}$) und $0,03 \mu\text{g cm}^{-2}$ (C_{26}) waren die auf der *cer1*-Linie nachgewiesenen Mengen ähnlich groß. In den Extrakten der *cer6*-Linie fand sich vor allem C_{26} - ($0,08 \mu\text{g cm}^{-2}$), C_{28} - ($0,08 \mu\text{g cm}^{-2}$) und C_{30} -Alkohol ($0,06 + 0,05 \mu\text{g cm}^{-2}$). Die Wachsextrakte der *cer9*-Linie enthielten nur sehr geringe Mengen Alkohole – Hauptalkoholkomponenten waren hier C_{26} - ($0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$) und C_{28} -Alkohol ($0,02 \mu\text{g cm}^{-2}$). Auf den *cer16*-Mutanten waren als Hauptkomponenten ebenfalls C_{30} - ($0,09 \mu\text{g cm}^{-2}$), C_{28} - ($0,08 \mu\text{g cm}^{-2}$) und C_{26} -Alkohol ($0,04 \mu\text{g cm}^{-2}$) zu finden, wobei auch hier keine Isoformen der Alkohole beobachtet wurden, die Menge an unverzweigtem C_{30} -Alkohol aber etwa so groß war wie die zusammengenommene Menge der Isoform und der unverzweigten Form des C_{30} -Alkohols auf dem Wildtyp. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in diesem Absatz auf die Angabe der Standardabweichungen verzichtet. Diese sind Abbildung 15 zu entnehmen.)

Die Gruppe „Anderes“ wurde bereits oben in Zusammenhang mit Abbildung 13 beschrieben. Dabei ist hinzuzufügen, dass in der Stoffklasse der „Monoacylglycerole“ vermutlich mit Glycerol veresterte Fettsäuren der Kettenlängen C24-C28 gefunden wurden. Die Mengenverteilung der Komponenten mit den jeweiligen Kettenlängen ist in Abbildung 16 mit der Verteilung der freien Fettsäuren der

entsprechenden Kettenlängen verglichen. Es ist auffällig, dass sich die größten Mengen dieser Komponenten auf die Kettenlängen C24, C26 und C28 verteilen, was auch dem Verhältnis der Mengenverteilung der freien Fettsäuren in den Wachsextrakten dieser Pflanzenlinie entspricht.

Weiterhin ist festzuhalten, dass bei C₂₄-, C₂₅- und C₂₇-Monoacylglycerol eine Überlagerung der Peaks in den Chromatogrammen durch C₃₀-, C₃₁- und C₃₃-Alkohol gegeben war. Das geschätzte Überlagerungsverhältnis dieser Peaks betrug im Fall des C₂₄-Monoacylglycerols lediglich etwa 10% Alkohol, im Fall der C₂₅- und C₂₇-Monoacylglycerole etwa 50%. Dieses würde im Fall von C₃₀-Alkohol etwa 0,006µg cm⁻² ausmachen und wäre daher wesentlich geringer als die auf den anderen Pflanzenlinien nachgewiesenen Mengen dieses Alkohols. Da die Mengen nicht exakt bestimmt werden konnten, wurden diese sehr geringen Mengen der drei Alkohole in diesem Fall nicht in die Stoffklasse der Alkohole eingeordnet, sondern verblieben in der Gruppe „Anderes“. Der in den Wachsextrakten der anderen vier Pflanzenlinien in großen Mengen gefundene C₃₂-Alkohol wurde jedoch auf der *cer9*-Mutante nicht gefunden. Auch der C₃₄-Alkohol wurde auf der *cer9*-Mutante im Gegensatz zu den anderen Pflanzenlinien nicht gefunden.

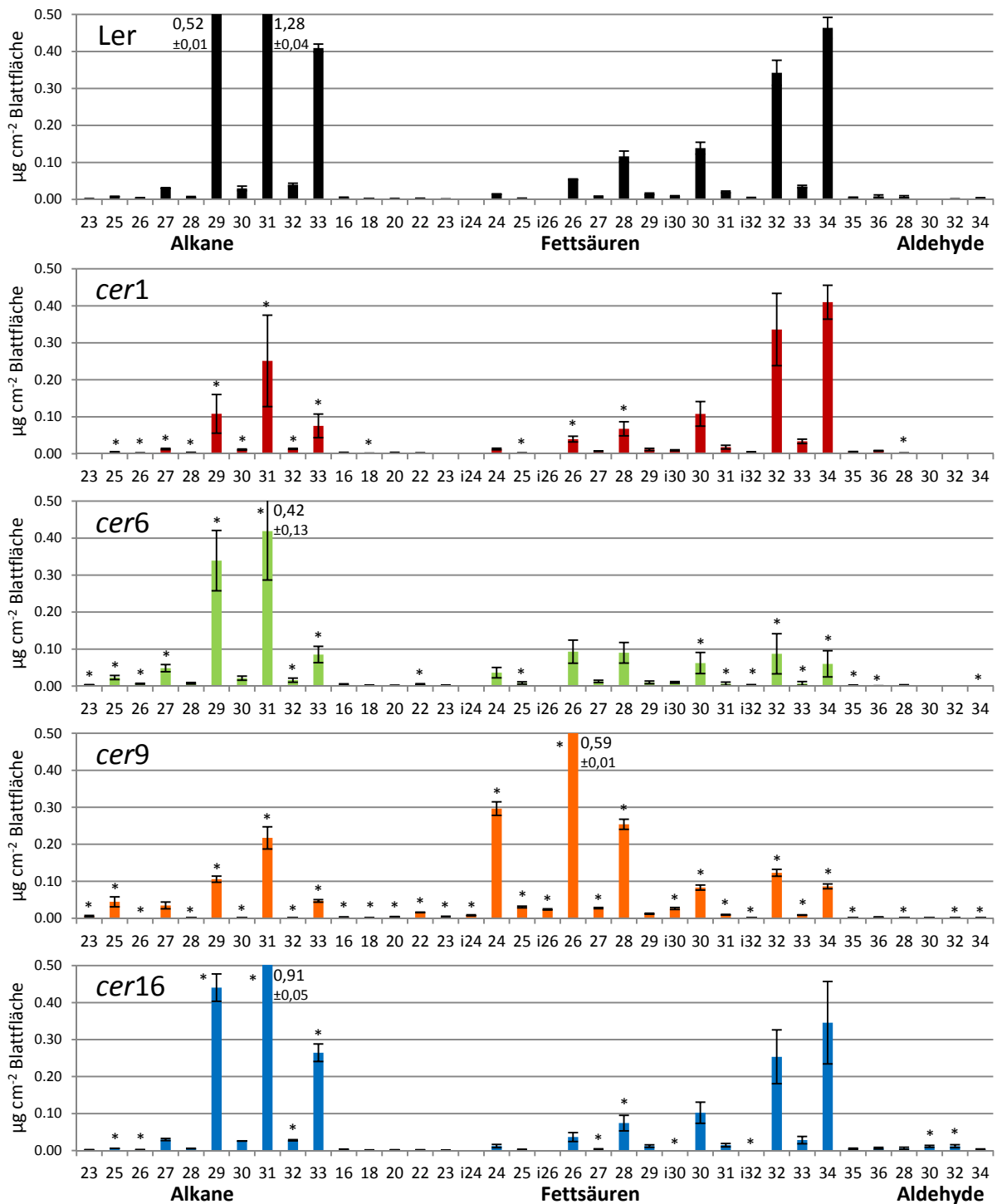


Abb. 14: Kettenlängenverteilung der in den kutikulären Wachsextrakten der Pflanzenlinien *Ler* (schwarz), *cer1* (rot), *cer6* (grün), *cer9* (orange) und *cer16* (blau) nach Freilandwachstumsperiode gefundenen Alkane, freien Fettsäuren und Aldehyden. Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Komponenten (je $n = 3 \pm \text{SD}$) in $\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche. Statistisch signifikante Mengenunterschiede zwischen den Wildtypextrakten und den Extrakten der einzelnen Pflanzenlinien sind mit * gekennzeichnet. Die zugehörigen p-Werte sind Tabelle K unter 7.5 im Anhang zu entnehmen.

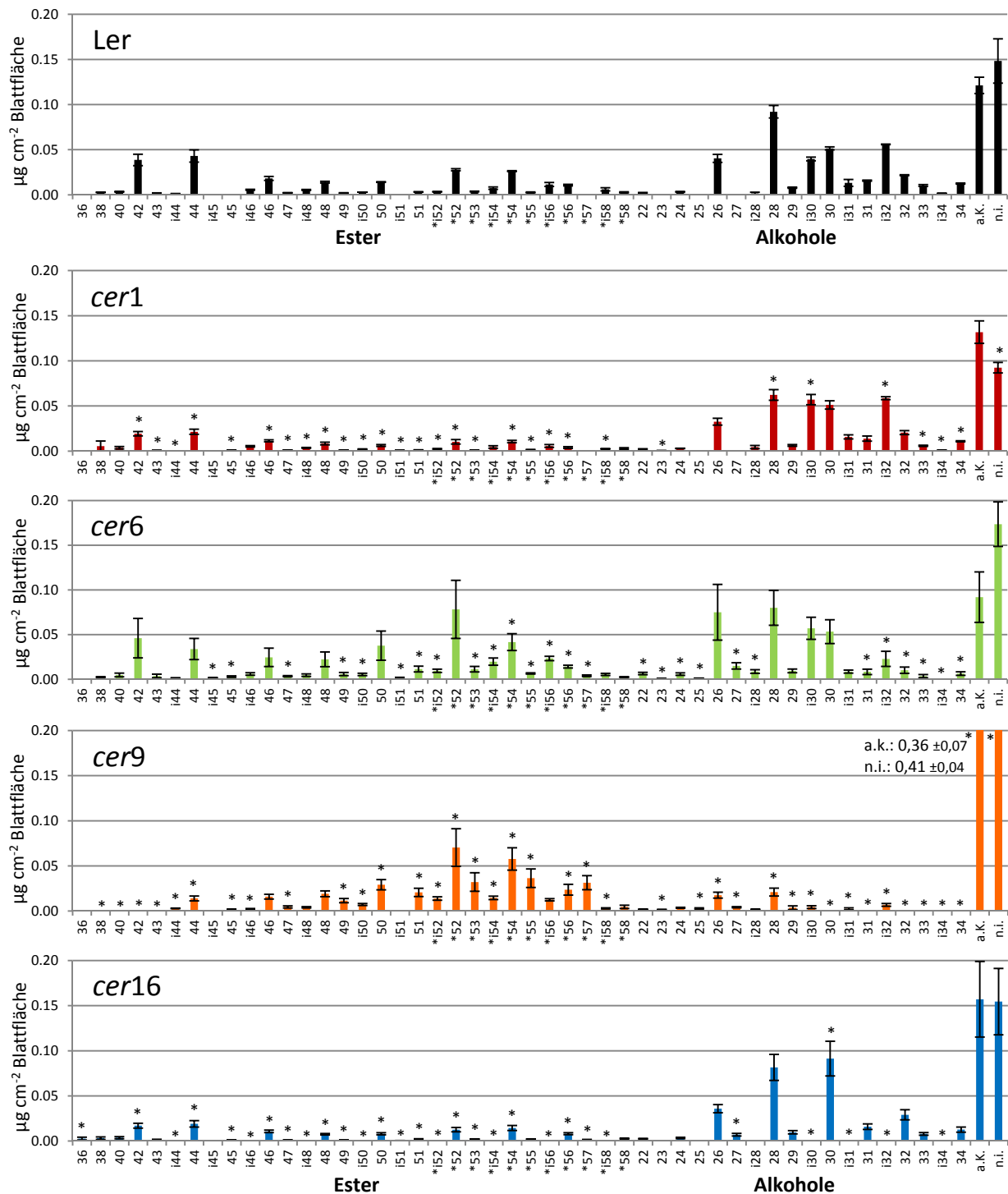


Abb. 15: Kettenlängenverteilung der in den kutikulären Wachsextrakten der Pflanzenlinien Ler (schwarz), *cer1* (rot), *cer6* (grün), *cer9* (orange) und *cer16* (blau) nach Freilandwachstumsperiode gefunden Ester, Alkohole, anderen Komponenten (a.K.) und nicht identifizierten Komponenten (n.i.). Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Komponenten (je $n = 3 \pm \text{SD}$). Die Kennzeichnung mit * vor der jeweiligen Kettenlänge deutet auf eine Identifizierung dieser Komponenten nach Peakabstand im Chromatogramm und nach charakteristischen Esterfragmentationen hin –eine eindeutige Identifizierung anhand von Vergleichsspektren war in diesen Fällen nicht mehr möglich, da die Aufnahme der Massenspektren bei m/z 750 endete. Vermutete Isoformen der Ester, die auf verzweigte Isoformen der Alkohole zurückgeführt wurden, wurden mit einem „i“ gekennzeichnet. Statistisch signifikante Mengenunterschiede zwischen den Wildtypextrakten und den Extrakten der einzelnen Pflanzenlinien sind mit * gekennzeichnet. Die zugehörigen p-Werte sind Tabelle K unter 7.5 im Anhang zu entnehmen.

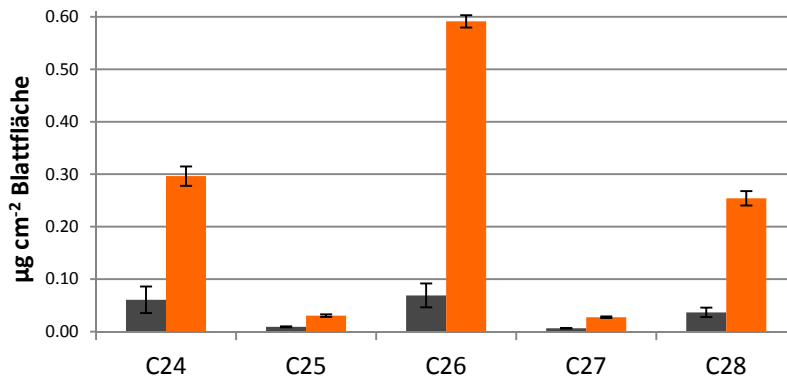


Abb. 16: Kettenlängenverteilung der putativen Monoacylglycerole (grau) im Vergleich zu der Verteilung der Fettsäuren der entsprechenden Kettenlängen in den kutikulären Wachs-extrakten der *cer9*-Mutante (orange). Dargestellt sind die Mittelwerte der Mengen der in den Extrakten gefundenen Komponenten (je $n = 3 \pm SD$) in $\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche.

4.1.3 Elektronenmikroskopische Betrachtungen

Die Blattoberflächen aller untersuchten *A. thaliana*-Linien wurden auch im Rasterelektronenmikroskop betrachtet, um mögliche Strukturveränderungen der Wachsaufgabe, die z.B. durch Unterschiede in der Wachszusammensetzung zustande kommen könnten, zu erfassen. Hierzu wurden in allem Fällen Pflanzen verwendet, die 12-14 Wochen alt und unter kontrollierten Bedingungen im Klimaschrank angezogen worden waren.

Im Falle aller untersuchten Pflanzenlinien wurde festgestellt, dass die Rosettenblätter lediglich eine glatte Wachsschicht ohne deutlich hervortretende Wachskristalle aufwiesen (Abb. 17). Blattober- und Unterseite wiesen keine erkennbaren Unterschiede auf. Die auffälligen Verwerfungen und Falten, die auf jedem Bild in unterschiedlicher Ausprägung zu sehen sind, sind als Trocknungsartefakte anzusehen. Hinsichtlich der hauptsächlichen Struktur der untersuchten Wachsflächen konnten also keine Unterschiede zwischen den Pflanzenlinien festgestellt werden.

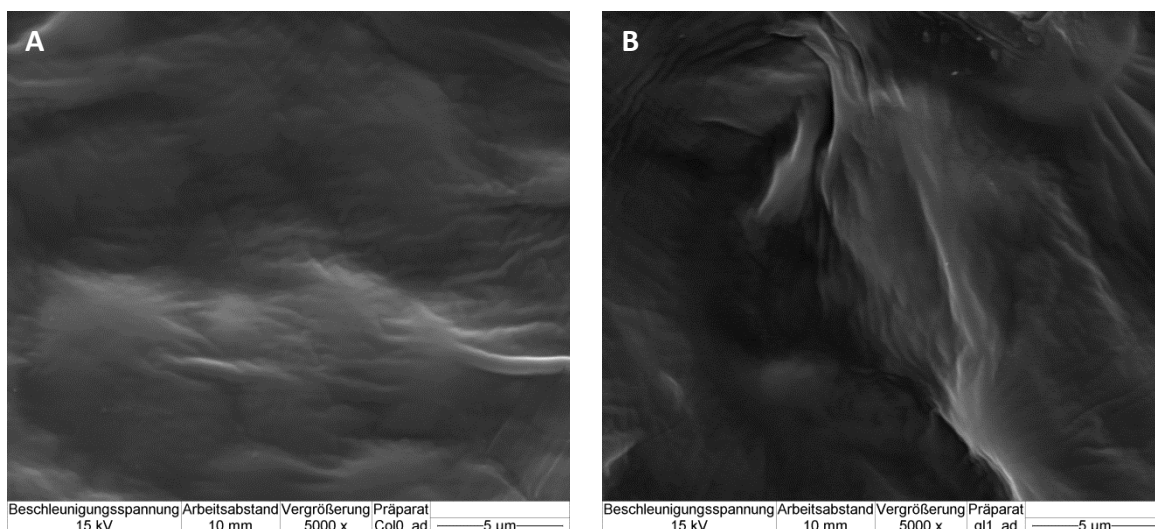


Abb. 17 – Fortsetzung nächste Seite

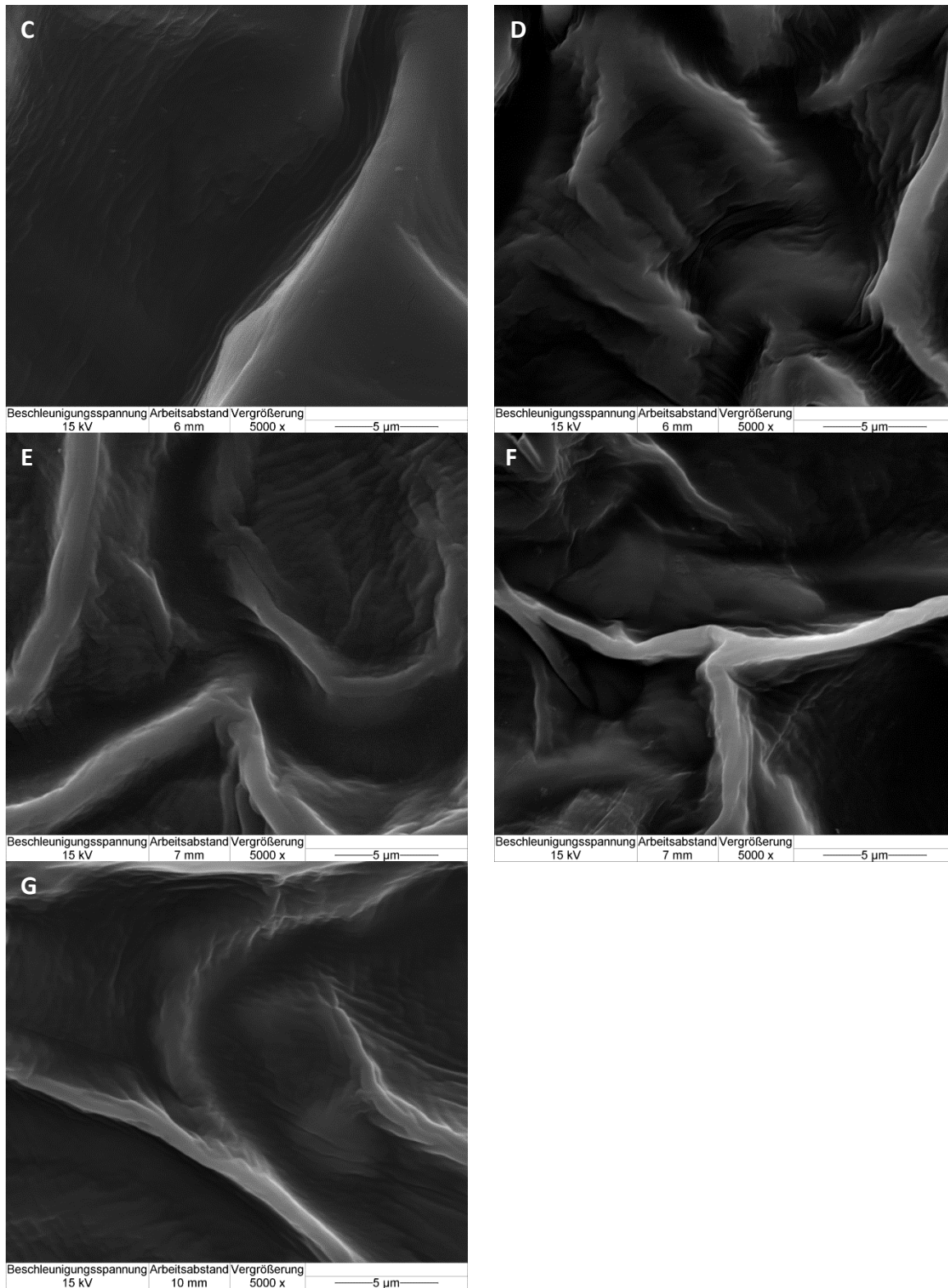


Abb. 17: Repräsentative, unter dem Rasterelektronenmikroskop gefertigte Aufnahmen der Blattoberflächen der *A. thaliana*-Linien Col-0 (A), *gl1* (B), *cer1* (C), *cer6* (D), *cer9* (E), *cer16* (F) und Ler (G). Es sind jeweils die Blattoberseiten der Pflanzen gezeigt. Für die Betrachtung der Col-0 und der *gl1*-Linie war jeweils ein Blatt einer Pflanze betrachtet worden, im Fall der *cer*-Linien und des Ler-Wildtyps waren je drei Blätter von drei unterschiedlichen Pflanzen betrachtet worden.

Unterschiede konnten im Vergleich der Col-0 und der *gl1*-Linie nur hinsichtlich der auf der Col-0-Linie vorhandenen Trichome beobachtet werden. Diese wiesen eine papilläre Oberflächenstruktur auf und waren auf den Blattspreiten der *gl1*-Mutante nicht vorhanden. Weiterhin auffällige strukturelle

Besonderheiten konnten auf den Linien Ler, *cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16* beobachtet werden. Vor allem im Bereich der Stomata traten gelegentlich kleine, kugelige bis sternförmige Strukturen auf. Solches umfasste jedoch jeweils nur kleine Blattbereiche und wurde auf allen Pflanzenlinien beobachtet (Abb. 18).

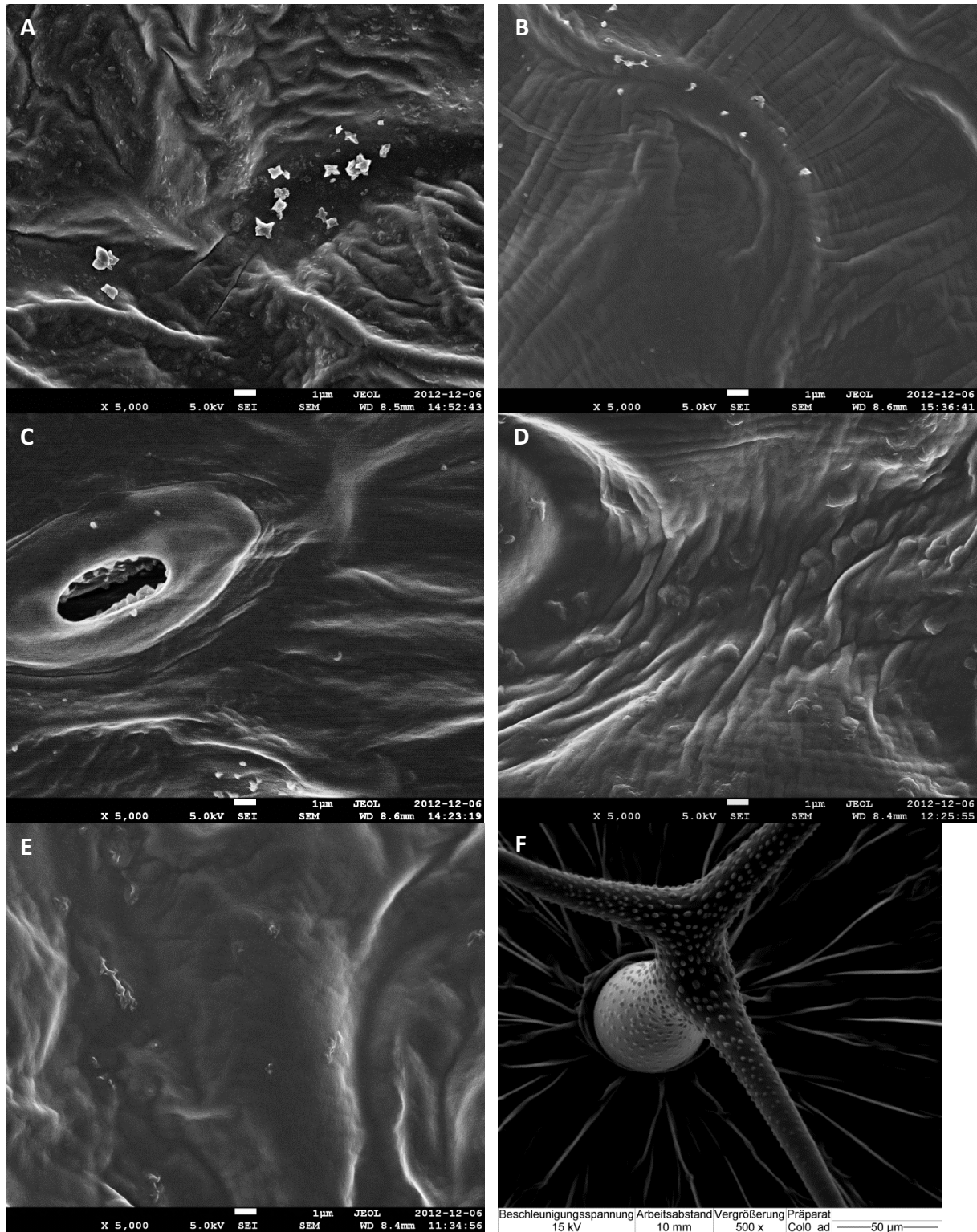


Abb. 18: Strukturelle Besonderheiten auf den untersuchten Blättern der *A. thaliana* Ler-, *cer1*-, *cer6*-, *cer9*- und *cer16*-Linien. A: sternförmige Strukturen auf *cer1*, B: punktförmige Erhebungen auf *cer6*, C: Stoma mit punktförmigen Erhebungen auf *cer9*, D: kugelige Strukturen in der Nähe eines Stomas auf *cer16*, E: strukturelle Auffälligkeiten auf Ler, F: Trichom mit papillärer Oberfläche auf Col-0.

4.2 Diversität kultivierbarer Isolate

Um Einblicke in die kultivierbare bakterielle Diversität in der *A. thaliana* Phyllosphäre zu erlangen, wurden im Verlauf der Arbeit mehrere Ansätze verfolgt. Einerseits wurde die minimale bakterielle Besiedelung auf Pflanzen nach Wachstum im Klimaschrank untersucht (4.2.1). Ziel war es hierbei, ein möglichst detailliertes Bild der kultivierbaren bakteriellen Diversität auf im Klimaschrank angezogenen Pflanzen zu erhalten, sowie Isolate für eventuelle zukünftige Inokulationsexperimente zu gewinnen. Andererseits wurden Bakterienisolate von Pflanzen, die eine Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten, gewonnen (4.2.2). Dabei sollte ein Eindruck und Vergleich der bakteriellen Diversität nach dem Freilandaufenthalt gebildet werden. Außerdem wurden hierbei erste Versuche mit einem Mineralmedium unternommen, welches später auch für eine Anreicherungskultivierung (4.2.3) von Bakterien mit der Fähigkeit langkettige Alkane zu verstoffwechseln verwendet wurde.

4.2.1 Bakterien auf *A. thaliana* Col-0

In der vorliegenden Arbeit wurden Blattabwaschproben von im Klimaschrank kultivierten *A. thaliana*-Col-0-Pflanzen auf sechs verschiedenen Medien ausgestrichen. Die Pflanzen entstammten mehreren hintereinander angezogenen Chargen des Jahrs 2009 und waren jeweils 9-11 Wochen alt. Die Kulturmedien waren auf Bakterien mit unterschiedlichen Ernährungsansprüchen abgestimmt. Zum einen wurde ein Vollmedium mit hoher Nährstoffkonzentration (LB) gewählt, um schnell wachsende Bakterien mit hohem Nährstoffbedarf zu isolieren. Eine 1:10-Verdünnung dieses Mediums (0,1 x LB) wurde verwendet, um das Wachstum langsamer wachsender Bakterien zu fördern, die ansonsten auf dem hochkonzentrierten Medium überwachsen worden wären. Weiterhin wurde ein weiteres 1:10 verdünntes Medium verwendet (0,1 x KB), bei dem Hefeextrakt fehlte, sowie ein Stärke enthaltendes Medium (M1), um Bakterien mit möglicherweise variablen Nährstoffansprüchen zu kultivieren. Außerdem wurde ein Mineralmedium verwendet, das entweder nur Methanol (MSM1) oder Glucose (MSM2) als Kohlenstoffquelle enthielt, um oligotroph lebende bzw. auf die Verstoffwechslung von Methanol spezialisierte Bakterien zu erfassen.

Insgesamt konnten von diesen Medien 115 bakterielle Isolate gewonnen und nach Teilsequenzierung identifiziert werden. Zur Identifizierung wurde der jeweils beste BLAST-Hit herangezogen. Die Zuordnung der Isolate in sieben bakterielle Phyla ist in Abbildung 19 gezeigt. Der größte Teil der isolierten Bakterien (31 Isolate = 27%) wurde den Alphaproteobakterien und den Gammaproteobakterien (27 = 23%) zugeordnet. Ebenso fanden sich viele, den Actinobakterien (16 Isolate = 14%) sowie dem Phylum Firmicutes (10 Isolate = 9%) zuzuordnende Bakterienisolate. Fünf Isolate (4%) der Betaproteobakterien sowie jeweils ein Isolat der Bacteroidetes und der Aquificae wurden gefunden. 24 Isolate (21%) zeigten größte Sequenzähnlichkeiten zu „nicht klassifizierten, unkultivierten Bakterien“.

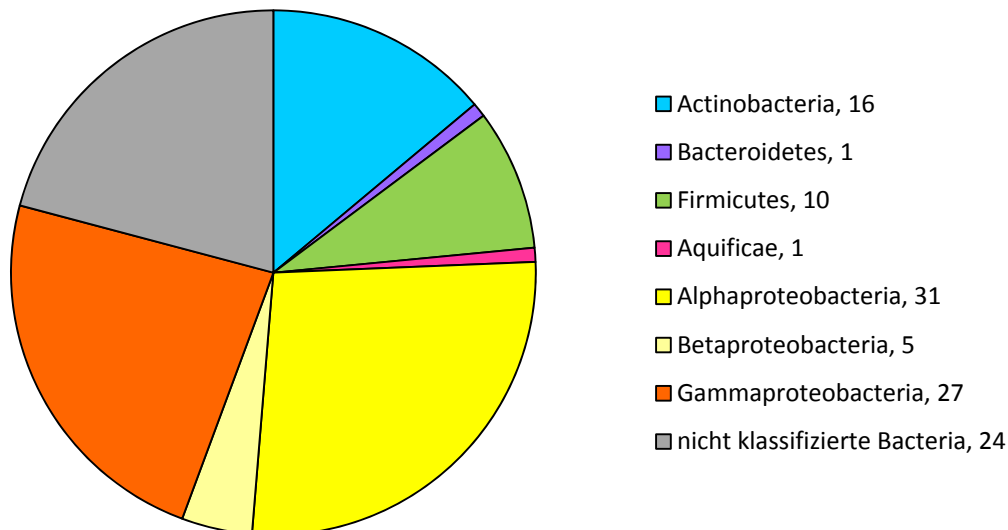


Abb. 19: Kuchendiagramm zur Darstellung der Phylum-/Subphylumverteilung aller gewonnenen Bakterienisolate. Die dem jeweiligen Phylum zugeordnete Anzahl an Isolaten ist nach dem Komma angegeben.

Die Isolate wurden insgesamt 35 Gattungen aus 21 Familien zugeordnet. Dabei fielen sieben Familien in das Phylum der Alphaproteobacteria, vier in die Actinobacteria, je drei in Beta- und Gammaproteobacteria, zwei in die Firmicutes und je eine in Bacteroidetes und Aquificae. Die in der Datenbank hinterlegten Isolationsquellen der Referenzstämmen waren in der Regel terrestrischer Natur, wie beispielsweise verschiedene Böden oder die pflanzliche Rhizo- oder Phyllosphäre. Von einigen der Isolate wurden Vollängensequenzen des 16S rRNA-Gens erstellt, die für die Berechnung eines phylogenetischen Baums benötigt wurden (siehe 4.3.4). Hierfür wurden Isolate so ausgewählt, dass sie ungefähr die Phylum-/ Subphylumverteilung der Gesamtsammlung repräsentierten. In Tabelle 2 sind alle, nach Lagerung lebensfähigen, Isolate mit der von ihnen erhaltenen Sequenzlänge und dem besten BLAST-Hit dargestellt. Isolate, von denen Vollängensequenzen erstellt wurden, sind in fetter Schrift enthalten.

Tabelle 2: Von *A. thaliana* Col-0 nach 10-12 Wochen Klimaschrankanzucht gewonnene Isolate. Am linken Rand sind die jeweiligen Medien angegeben, die zur Isolierung der jeweiligen Bakterien verwendet wurden. Phylum/Subphylum-Zugehörigkeit der Isolate ist farblich indiziert sowie am rechten Rand durch Kürzel angegeben: blau (Act) = Actinobacteria, grün (Fir) = Firmicutes, gelb (α P) = Alphaproteobacteria, hellgelb (β P) = Betaproteobacteria, orange (γ P) = Gammaproteobacteria, pink (Aqu) = Aquificae, Violett (Bac) = Bacteroidetes, grau (ni) = nicht klassifiziertes Bakterium. Der e-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Missidentifizierung der Suchsequenz aufgrund zufälliger Sequenzähnlichkeiten zu anderen Datenbankeinträgen. Einträge in fetter Schrift basieren auf annähernden Vollängensequenzen der jeweiligen Isolate.

Isolat	Länge	Bester BLAST-Hit	Accession	Ähnlichkeit	e-Wert	
2	1493	<i>Agromyces</i> sp. 3098BRRJ	FJ200379.2	99%	0	
13	551	<i>Brevibacterium</i> sp.	KC466227	99%	0	
14	301	<i>Brevibacterium</i> sp.	JQ014308.1	99%	2E-132	
19	301	<i>Brevibacterium</i> sp.	JQ014308.1	97%	9E-126	
6	551	<i>Microbacterium</i> sp.	KC415768.1	99%	0	
20	301	<i>Microbacterium pumilum</i>	JQ689185.1	99%	3E-110	Act
10	551	<i>Bacillus</i> sp.	JX122829.1	99%	0	

LB- Medium	17	1516	Bacillus weihenstephanensis KBAB4	CP000903.1	99%	0	
	22	301	Uncultured Bacilli bacterium	AY214770.1	93%	2E-73	
	24	301	<i>Bacillus</i> sp.	KC310814.1	81%	0.00002	
	32	301	<i>Bacillus</i> sp.	JQ399790.1	91%	2E-89	
	31	301	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	AB680893.1	97%	1E-143	Fir
	3	551	<i>Brevundimonas</i> sp.	GU003879.1	99%	0	
	38	301	<i>Brevundimonas</i> sp.	EU741063.1	91%	3E-66	
	5	551	<i>Kaistia</i> sp.	FJ719344.1	99%	0	
	37	1453	Uncultured <i>Kaistia</i> sp. Clone A02-11H	FJ542829.1	99%	0	
	1	551	<i>Rhizobium gallicum</i>	AY972354.1	99%	0	
	29	301	<i>Shinella zoogloeoides</i>	AB698675.1	96%	9E-136	
	8	1452	<i>Roseomonas genomospecies</i> 4 ATCC 49959	AY150048.1	99%	0	
	9	551	<i>Novosphingobium</i> sp.	JN228321.1	100%	0	
	30	301	<i>Sphingomonas wittichii</i>	NR_074268.1	97%	1E-144	αP
	12	551	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ977150.1	99%	0	
	18	551	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC987014.1	99%	0	
	26	721	<i>Pseudomonas</i> sp.	HE603491.1	100%	0	
27	721	<i>Pseudomonas</i> sp.	HE603491.1	100%	0		
25	301	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC987014.1	99%	1E-148		
34	301	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC311621.1	99%	8E-141		
39	301	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	HF572854.1	98%	2E-146		
21	301	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	KC788631.1	99%	2E-147	γP	
11	1446	Uncultured bacterium clone YB-59	JQ769685.1	97%	0		
15	551	Bacterium	AY822573.1	99%	0		
23	301	Uncultured bacterium	JF489465.1	97%	1E-69		
35	301	Uncultured bacterium	FN421651.1	99%	3E-150	ni	
MSM 1&2	46	300	Uncultured <i>Hydrogenobaculum</i> sp.	DQ834161.1	74%	0.042	Aqu
	41	651	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	KC355325.1	98%	0	αP
	42	501	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HE610893.1	97%	0	
	43	721	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	99%	0	
	49	651	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	99%	0	γP
	47	1513	Uncultured bacterium clone FB98	JX133591.1	99%	0	
	48	261	Uncultured organism	HQ749670.1	86%	1E-78	ni
0,1xKB-Medium	K12	501	<i>Salinibacterium</i> sp.	DQ667068.1	89%	0	
	K13	121	<i>Yonghaparkia alkaliphila</i>	KC920944.1	98%	9E-52	
	K1	681	<i>Micromonospora auratiaca</i>	KC823162.1	97%	0	
	K27	1489	<i>Microbacterium</i> sp. BM-25	AY635868.1	98%	0	Act
	K4	121	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	HQ703953.1	88%	5E-34	
	K5	1502	<i>Brevibacillus nitrificans</i>	AB507254.2	99%	0	Fir
	K8	241	<i>Rhizobium</i> sp.	JF423116.1	85%	4E-53	
	K15	255	<i>Shinella yambaruensis</i>	KC778586.1	96%	1E-108	
	K14	1491	<i>Paracoccus</i> sp. MBIC4020	AB025191.1	95%	0	
	K21	1428	<i>Paracoccus</i> sp. FLN-7	EU725799.1	99%	0	
	K10	255	<i>Novosphingobium</i> sp.	JN228321.1	97%	2E-117	
	K6	151	<i>Sphingopyxis</i> sp.	JX185740.1	98%	1E-66	
K9	1453	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> strain: Gsoil 124	AB245353.1	99%	0	αP	
K2	250	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	EU580699.1	94%	2E-102		
K23	701	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	JX949586.1	98%	0	βP	
K17	1504	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. clone 85	JN082538.1	99%	0		

	K24	341	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp.	KC481247.1	86%	1E-109	
	K25	450	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp.	KC481247.1	98%	0	
	K22	531	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	97%	0	
	K19	1512	<i>Rhodanobacter</i> sp. 116-2	JF719061.1	99%	0	yP
	K20	441	Uncultured bacterium	JF175463.1	98%	0	
	K7	1483	Uncultured bacterium clone B4M69D3	AY957948.1	99%	0	ni
0,1xLB-Medium	L9	1493	<i>Kocuria</i> sp. CNJ900 PL04	DQ448710.1	99%	0	
	L8	674	<i>Micrococcus</i> sp.	HM153802.1	99%	0	Act
	L5	181	<i>Chryseobacterium</i> sp.	FR872481.1	82%	3E-44	Bac
	L6	681	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	AB680893.1	89%	0	
	L17	771	<i>Paenibacillus</i> sp.	AB773242.1	98%	0	
	L1	1488	Uncultured <i>Pedobacter</i> sp. SNNP_2012-103	JX114436.1	98%	0	Fir
	L19	1425	<i>Brevundimonas</i> sp. VTT E-052914	EF093132.1	99%	0	
	L4	1450	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp. G15-14-C11	FJ192500.1	99%	0	
	L3	141	<i>Shinella yambaruensis</i>	KC778586.1	95%	5E-55	
	L20	1453	<i>Sphingomonas</i> sp. SaMR12	JN573357.1	99%	0	
	L16	701	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	99%	0	
	L22	701	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	98%	0	yP
	L13	601	Uncultured organism	HQ780301.1	96%	0	
	L15	602	Uncultured bacterium	KC432045.1	96%	0	
	L2	171	Uncultured soil bacterium	JF372845.1	94%	3E-68	
	L21	631	Uncultured bacterium	FJ934014.1	99%	0	
	L7	680	Uncultured bacterium	GU133227.1	98%	0	ni
M1-Medium	M19	281	<i>Microbacterium</i> sp.	HF571532.1	90%	6E-97	
	M2	351	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	JQ282803.1	89%	5E-129	
	M27	341	<i>Microbacterium</i> sp.	GU143681.1	95%	4E-154	Act
	M22	331	<i>Brevibacillus centrosporus</i>	AB680893.1	89%	2E-122	Fir
	M8	451	<i>Methylobacterium extorquens</i>	NR_074138.1	94%	0	
	M4	341	<i>Shinella zoogloeoides</i>	AB698675.1	89%	4E-120	
	M24	1452	<i>Sphingomonas</i> sp. SaMR12	JN573357.1	99%	0	
	M9	271	<i>Paracoccus</i> sp.	HM018693.1	88%	3E-90	
	M7	1454	<i>Novosphingobium</i> sp. NIY3	AB360760.1	99%	0	αP
	M16	141	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	EU877076.1	79%	4E-16	
	M6	281	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp.	EF033497.1	87%	1E-88	βP
	M10	271	<i>Acinetobacter bouvetii</i>	HQ202827.1	83%	1E-74	
	M11	271	Uncultured <i>Acinetobacter</i> sp.	FJ192952.1	83%	2E-71	
	M1	301	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC505201.1	78%	3E-66	
	M12	1503	<i>Pseudomonas</i> sp. EL7	FJ517620.1	99%	0	
	M13	581	<i>Pseudomonas mandelii</i>	KC778401.1	98%	0	
	M14	501	<i>Pseudomonas</i> sp.	HE794922.1	97%	0	
M15	381	<i>Pseudomonas</i> sp.	HE794922.1	96%	2E-177		
M18	501	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC987014.1	97%	0		
M26	411	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HE610893.1	96%	0		
M20	1510	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> str. AMX 26B	NR_025105.1	99%	0	yP	
M5	1494	Uncultured bacterium clone JdFBDF34-26	JQ678582.1	99%	0		
M17	141	Uncultured organism	HQ780301.1	90%	9E-43		
M21	431	Bacterium enrichment culture clone	KC853653.1	95%	0		
M23	1452	Uncultured bacterium clone AS18	JN869178.1	99%	0	ni	

4.2.2 Bakterien auf *A. thaliana* Ler nach Freilandperiode

Die Betrachtung der kultivierbaren Diversität auf *A. thaliana*, die eine Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten, fiel weniger aufwändig aus, da hier keine detaillierte Untersuchung kultivierbarer Bakterien erfolgen, sondern lediglich ein Überblick zum Vergleich mit den Gemeinschaften aus dem Klimaschrank gewonnen werden sollte. Für die Kultivierungsversuche wurden hier nur zwei Kulturmedien verwendet (0,1xLB und MSM3), das MSM3-Medium wurde später auch für die Anreicherungskultivierung (siehe 4.2.3) verwendet. Die Pflanzen wurden mit etwa 12 Wochen, nach einer vierwöchigen Freilandwachstumsperiode der Jahre 2010 (Isolate D1-D15, Hex1-5) und 2012 (Isolate S1-3), verwendet.

Innerhalb der gewonnenen 23 Isolate überwogen die Actinobakterien (9 Isolate), gefolgt von den Phylotypen, die in die Alphaproteobakterien fielen (5 Isolate). Die Teilsequenzen von vier Isolaten waren den Gammaproteobakterien zugehörig und je 1 Isolat wurde in die Bacteroidetes, die Firmicutes und die Betaproteobakterien eingeordnet. Zwei Isolate wurden als „nicht klassifizierte Bakterien“ eingestuft. Die Isolate entstammten phylogenetisch 11 Familien und 12 Gattungen. Im Vergleich zu den im Klimaschrank kultivierten Pflanzen fiel die starke Präsenz der Actinobakterien, hier vor allem der Gattung *Microbacterium* (5 Isolate) auf, sowie die Gattungen *Pseudomonas* und *Methylobacterium* (je 3 Isolate). Diese Gattungen waren auch auf im Klimaschrank kultivierten Pflanzen vertreten. Die Gattungen *Rhodococcus*, *Plantibacter*, *Bosea*, *Delftia* und *Rheinheimera* wurden im Zuge dieser Arbeit nur von Pflanzen nach Freilandwachstumsperiode isoliert. Alle Isolate, die auch nach längerer Lagerung noch lebensfähig waren sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Isolate, die von *A. thaliana* Ler Wildtyp-Rosetten nach vierwöchiger Freilandwachstumsperiode gewonnen wurden. Phylum/Subphylum-Zugehörigkeit der Isolate ist farblich indiziert sowie am linken Rand durch Kürzel angegeben: blau (Act) = Actinobacteria, grün (Fir) = Firmicutes, gelb (α P) = Alphaproteobacteria, hellgelb (β P) = Betaproteobacteria, orange (γ P) = Gammaproteobacteria, Violett (Bac) = Bacteroidetes, grau (ni) = nicht klassifiziertes Bakterium.

	Isolat	Länge	Bester BLAST-Hit	Accession	Ähnlichkeit	e-Wert	Phylum
0,1xLB-Medium	D6	601	<i>Rhodococcus fascians</i>	KC494315.1	99%	0	
	D10	551	<i>Brevibacterium</i> sp.	KC466227.1	99%	0	
	D3	551	<i>Microbacterium</i> sp.	KC019192.1	99%	0	
	D9	551	<i>Microbacterium</i> sp.	KC019192.1	99%	0	
	D13	451	<i>Microbacterium</i> sp.	AB740370.1	99%	0	
	S1	981	<i>Microbacterium</i> sp.	KC853146.1	99%	0	
	S3	862	<i>Microbacterium oleivorans</i>	KC764962.1	100%	0	
	D7	501	<i>Plantibacter</i> sp.	HF548388.1	99%	0	Act
	D4	601	<i>Chryseobacterium</i> sp.	JX827629.1	99%	0	Bac
	D2	361	<i>Bacillus muralis</i> strain	GU188930.1	97%	4E-170	Fir
	S2	961	<i>Bosea</i> sp.	HF548425.1	99%	0	α P
	D8	551	<i>Delftia lacustris</i>	HE610899.1	99%	0	β P
	D1	401	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC816556.1	94%	3E-166	
	D5	571	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	KC790237.1	99%	0	
	D12	601	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC816556.1	99%	0	γ P
D11	600	Uncultured bacterium	JF228378.1	99%	0	ni	
MSM3	Hex1	501	<i>Methylobacterium marchantiae</i>	AB698714.1	99%	0	
	Hex2	541	<i>Methylobacterium marchantiae</i>	AB698714.1	100%	0	
	Hex3	582	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AB302928.1	100%	0	α P

4.2.3 Anreicherungskultivierung mit Hexadecan und Docosan

Da Bakterien in der Phyllosphäre von langkettigen Kohlenwasserstoffen umgeben sind, sollten hier Bakterien mit der Fähigkeit z.B. langkettige Alkane als Kohlenstoffquelle zu nutzen, gewonnen werden. Dazu wurden Bakterien aus Blattabwaschsuspensionen in mit langkettigen Alkanen versetzten Mineralmedien angereichert. Die verwendeten Pflanzen des Ler Wildtyps waren etwa 12 Wochen alt und hatten eine vierwöchige Freilandanzuchtperiode durchlaufen. Ein Medium enthielt ausschließlich C_{16} -Alkan als Kohlenstoffquelle (MSM3-Medium). Es wurden jeweils fünf parallele Ansätze, die mit den Blattabwaschsuspensionen fünf verschiedener Pflanzen inokuliert waren beobachtet. Zusätzlich wurden Negativkontrollen angesetzt, die nur Medium und Alkan oder nur Bakteriensuspension aber keine Kohlenstoffquelle enthielten.

Bei den Kulturen zeigte sich nach einigen Tagen bei 30°C und Schütteln ein Abflachen der vorher deutlich abgegrenzten Alkan-Schicht sowie die Bildung von Bläschen am Phasenübergang. Nach etwa 7 Wochen Wachstum hatten sich deutlich unterschiedlich gefärbte Bakteriensuspensionen entwickelt die die Alkan-Schicht durchdrungen zu haben schienen. Den Kulturen wurde nun wieder ein Aliquot entnommen und ein frischer Kulturansatz damit angeimpft. Nach weiteren vier Wochen Wachstum wurden Aufnahmen sowohl des ersten als auch des zweiten Kulturansatzes gemacht, die in Abbildung 20A und B gezeigt sind.

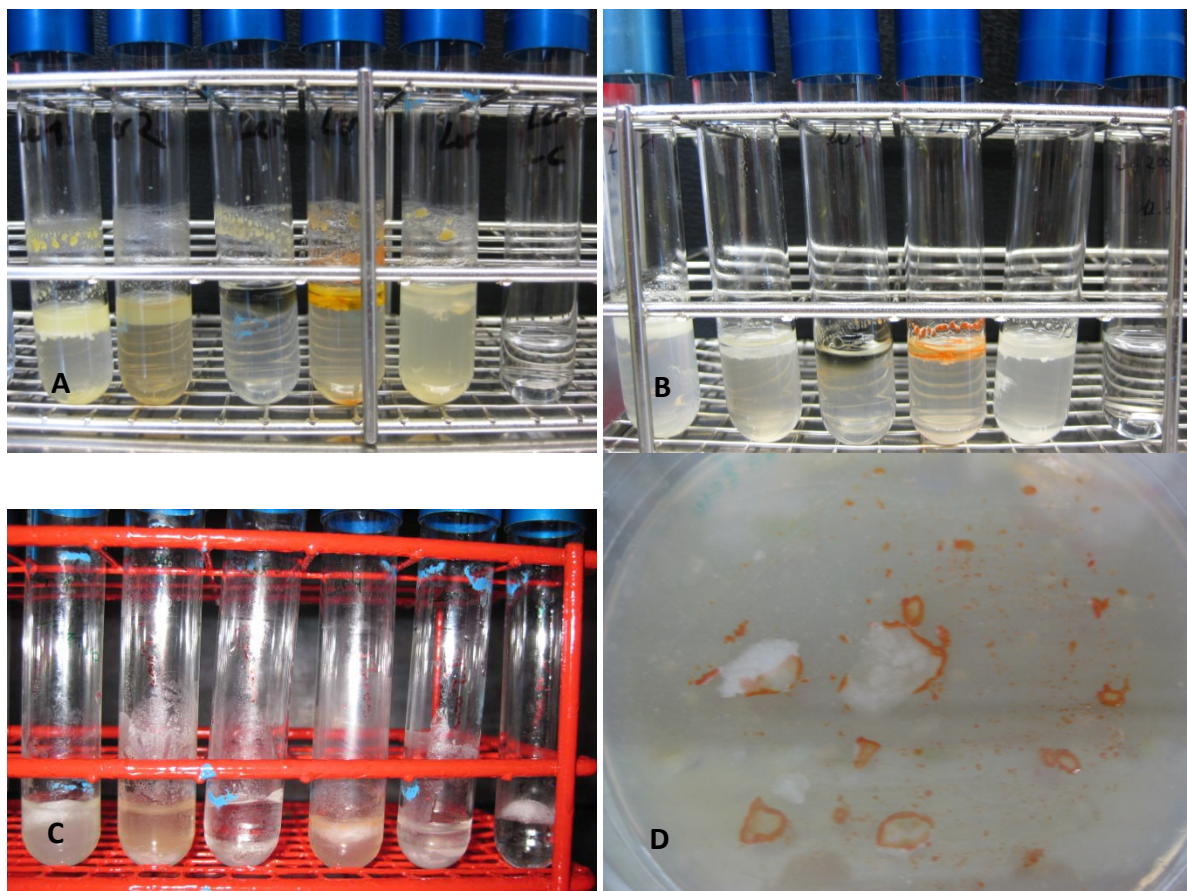


Abb. 20: 1. (A) bzw. 2. (B) Anreicherungsschritt von Blattabwaschsuspensionen in Mineralmedium, das mit C_{16} -Alkan als einziger Kohlenstoffquelle versetzt war (MSM3). Die Kulturen wurden nach 11 (A) bzw. 4 (B) Wochen Wachstum aufgenommen. Es sind jeweils von links nach rechts Ansätze, die mit Blattabwaschsuspension von fünf verschiedenen Pflanzenindividuen angeimpft waren, sowie eine Negativkontrolle ohne Kohlenstoffquelle gezeigt. C zeigt den dritten Anreicherungsschritt nach 7 Wochen Wachstum bei 30°C der Kulturen nach

Überimpfung auf Flüssigmedium das mit (bei 30°C festem) C₂₂-Alkan als Kohlenstoffquelle ergänzt war. D zeigt das Wachstum eines bakteriellen Morphotyps nach 7 Wochen auf einer MSM4-Kulturplatte. Der Morphotyp wurde als Isolat Do2 in die Sammlung aufgenommen.

Weitere drei Wochen später wurden Aliquots der Kulturen erneut in frische Ansätze überführt. Außerdem wurden weitere Aliquots der Kulturen in Ansätze überführt, die mit C₂₂-Alkan (statt C₁₆-Alkan) als Kohlenstoffquelle ausgestattet waren (MSM4-Medium). Die mit C₂₂-Alkan ergänzten Flüssigkulturen wurden nach 7 Wochen Wachstum noch ein weiteres Mal in frische Kulturansätze überführt und nach weiteren 7 Wochen ebenfalls fotografiert (Abb. 20C). Es waren Veränderungen der Färbung in den jeweiligen Ansätzen im Vergleich zur Kultur mit C₁₆-Alkan erkennbar.

Um Isolate für Inokulationsexperimente zu gewinnen wurden nach den ersten zwei Anreicherungen in C₁₆-Alkan-Flüssigkultur Aliquots der Ansätze auf Agarplatten, die MSM3 oder MSM4 enthielten, ausplattiert und nach einer Woche Wachstum bei 30°C und 6 Wochen bei Raumtemperatur Kolonien isoliert (Tab. 4). Auf den C₁₆-Alkan-Platten zeigte sich das Wachstum mehrerer unterschiedlicher Kolonien. Auf den C₂₂-Alkan-Platten war jedoch meist nur ein Morphotyp je Ansatz erkennbar. Das Wachstum eines Isolats wurde unter dem Binokular betrachtet und dokumentiert (Abb. 20D). Es zeigte sich hier deutlich das Wachstum der Bakterien um die (bei Raumtemperatur festen) C₂₂-Alkan-Kristalle im Medium. Insgesamt wurden 17 Isolate gewonnen und das 16S rRNA-Gen teilsequenziert. 12 Isolate wurden den Actinobakterien zugerechnet. Davon waren 9 der Gattung *Rhodococcus*, zwei der Gattung *Pseudomonas* und ein Isolat der Gattung *Xanthobacter* zugehörig. Weitere zwei Isolate zeigten größte Sequenzähnlichkeiten zu bisher nicht klassifizierten Bakterien.

Tabelle 4: Isolate von *A. thaliana* Ler Wildtyp-Rosetten nach vierwöchiger Freilandwachstumsperiode. Die verwendeten Isolationsmedien sind am linken Rand angegeben. Die Phylum/Subphylum-Zugehörigkeit der Isolate ist farblich indiziert sowie am rechten Rand durch Kürzel angegeben: blau (Act) = Actinobacteria, gelb (αP) = Alphaproteobacteria, orange (γP) = Gammaproteobacteria, grau (ni) = nicht klassifiziertes Bakterium.

	Isolat	Länge	Bester BLAST-Hit	Accession	Ähnlichkeit	e-Wert	
MSM3	Hex7.1	521	<i>Rhodococcus</i> sp.	HF912862.1	97%	0	
	Hex8	581	<i>Rhodococcus</i> sp.	HF912862.1	97%	0	
	Hex9	470	<i>Rhodococcus</i> sp.	KC994889.1	90%	0	
	Hex11	281	<i>Rhodococcus</i> sp.	FM998724.1	96%	8E-131	
	Hex12	411	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JX454781.1	93%	0	
	Hex13	601	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KC920956.1	99%	0	
	Hex15	360	<i>Rhodococcus fascians</i>	KC494315.1	98%	4E-175	
	Hex16	261	<i>Williamsia</i> sp.	KF003399.1	91%	2E-91	Act
	Hex7.3	570	<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i>	AB106864.1	99%	0	αP
	Hex10	411	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	KC244341.1	100%	0	γP
Hex6	286	Uncultured soil bacterium	JF376489.1	93%	9E-126		
Hex14	421	Uncultured bacterium	JF219823.1	98%	0	ni	
MSM4	Do1	361	Actinobacterium	AY358002.1	99%	0	
	Do2	341	Actinobacterium	AY358002.1	98%	6E-168	
	Do3	671	<i>Rhodococcus</i> sp.	JQ977382.1	99%	0	
	Do5	481	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JN967759.1	99%	0	Act
	Do4	391	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC904089.1	97%	0	γP

Mit dem Isolat Do5 wurde die Möglichkeit des Wachstums dieser Bakterien auf isolierten Birnenkutikeln in einem Vorversuch untersucht. Dabei wurde das gleiche Medium ohne Kohlenstoffquelle in Kulturröhrchen durch die Zugabe einer isolierten Kutikula eines Birnenblatts (Altbestand Botanik II) ergänzt und mit einer Kolonie des Isolats angeimpft. Nach etwa 3 Monaten Inkubationszeit wurde allerdings außer einer leichten, flockigen Trübung hauptsächlich am Glasrand kein offensichtliches Wachstum der Bakterien beobachtet (Abb. 21).

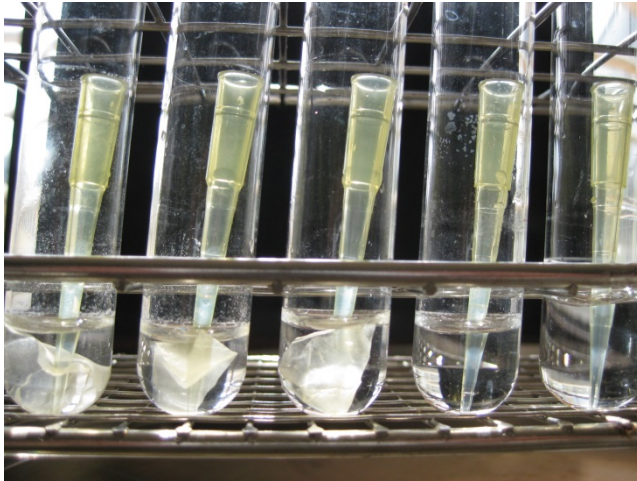


Abb. 21: Wachstum des Isolats Do5 in mit isolierten Birnenkutikeln versetztem MSM-Medium nach ca. 3 Monaten Wachstum bei 30°C. Zu sehen sind von links nach rechts: 2 Ansätze mit Isolat und Kutikeln, ein Ansatz mit einer Kutikula und ohne Isolat, ein Ansatz mit Isolat und ohne Kutikula und ein Ansatz ohne Kutikula und ohne Isolat.

4.2.4 Mikroskopische Betrachtungen

Bakterien auf Blattoberflächen waren insgesamt schwer abzubilden. Bei den unternommenen Versuchen wurden Blätter von *A. thaliana* Col-0 nach einer Freilandwachstumsperiode unter dem Epifluoreszenzmikroskop nach vorherigem Anfärben mit DAPI betrachtet (Abb. 22). Es zeigten sich einzelne sowie aggregierte Zellen, deren Umrisse und Lage auf dem Blatt allerdings eher unscharf erschienen. Ein großes Problem stellte hierbei die unebene Blattoberfläche sowie die starke Hintergrundfluoreszenz durch Chlorophyll dar.

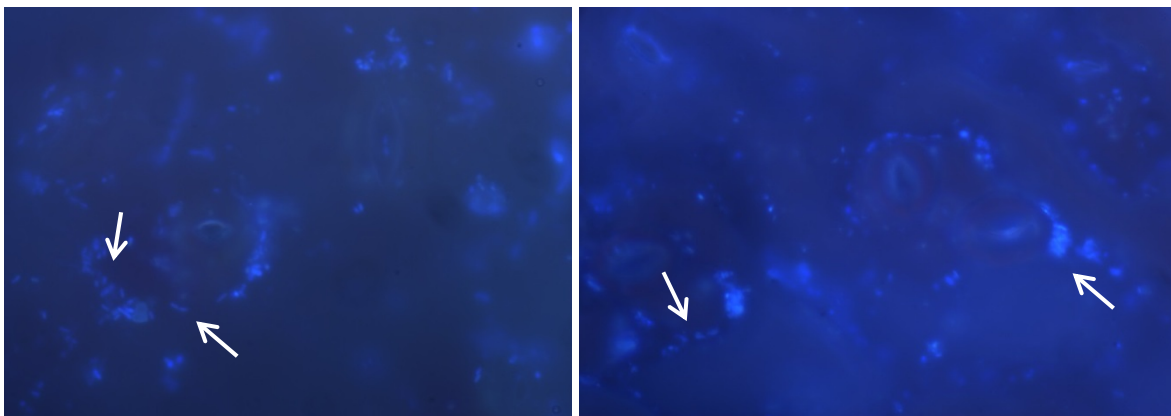


Abb. 22: Darstellung von Bakterien auf Blättern von *A. thaliana* Col-0 nach Freilandwachstumsperiode. Die Blätter wurden nach vorheriger Färbung der Blattoberflächen und darauf befindlicher Zellen mit DAPI unter UV-Licht in einem Epifluoreszenzmikroskop mit einer 100x Vergrößerung betrachtet. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf vermutet bakterielle Zellen oder deren Aggregate.

Weiterhin wurden Blattoberflächen von im Klimaschrank angezogenen Pflanzen unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Dabei zeigten sich einzelne bakterienähnliche Strukturen, sowie möglicherweise biofilmartige Schichten (Abb. 23). Bei dieser Art von Mikroskopie lag das Problem in der geringen Ausschnittgröße der jeweils dargestellten Blattoberfläche. Außerdem besteht für nicht inokulierte Oberflächen Unsicherheit über den bakteriellen Ursprung der betrachteten Strukturen, da für die Rasterelektronenmikroskopie kein Anfärben bakterieller Proteine oder DNA erfolgen kann. Zudem ist unbekannt, in welcher Weise die Austrocknung der Präparate die Bakterienstruktur verändert.

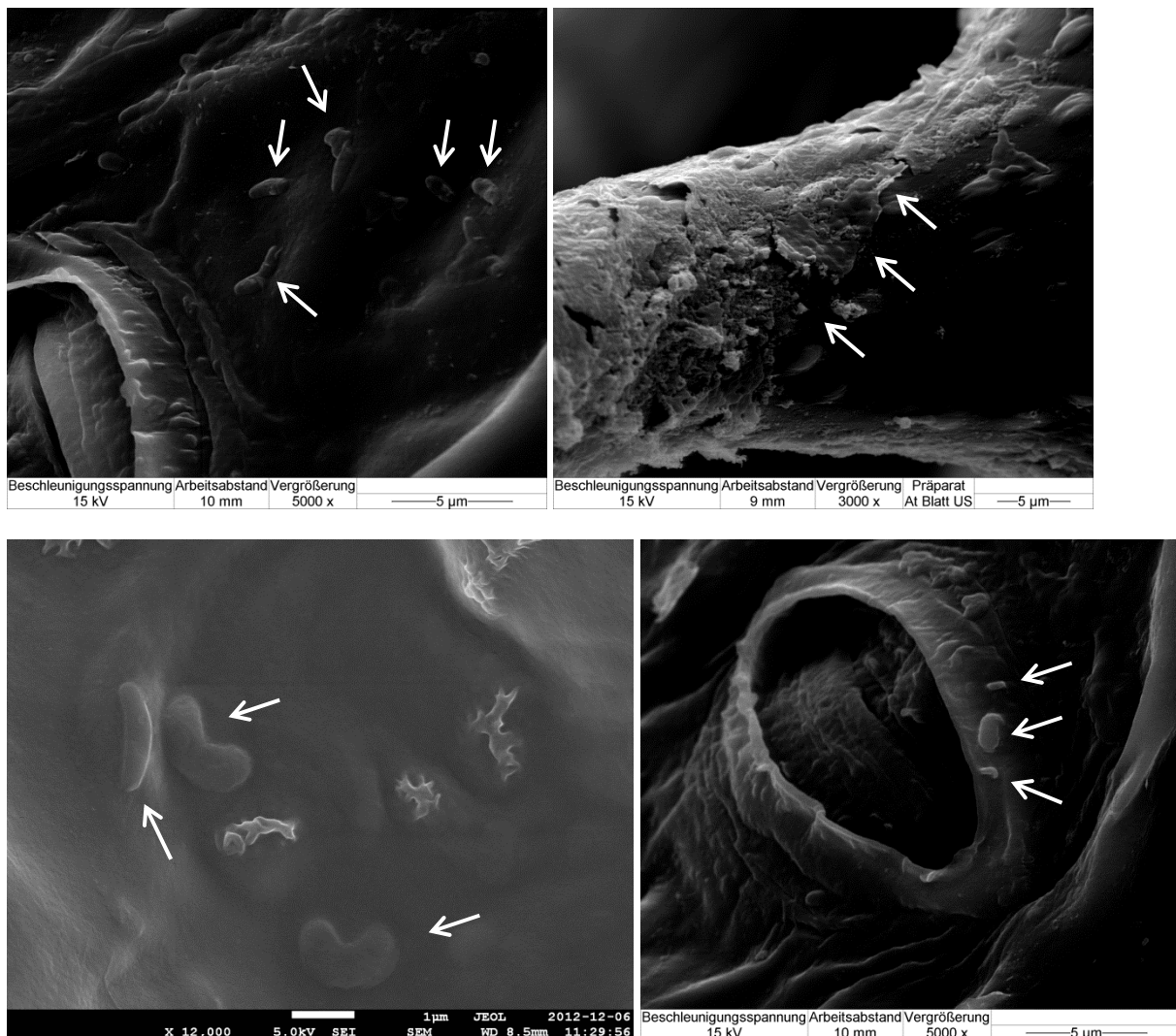


Abb. 23: Darstellung von potenziellen Bakterienzellen auf Blättern von *A. thaliana* Col-0 und Ler nach Wachstum im Klimaschrank. Die Blätter wurden nach Austrocknung in einem Rasterelektronenmikroskop mit der jeweils angegebenen Vergrößerung betrachtet. Potenzielle bakterielle Zellen bzw. eine biofilmartige Struktur sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um ein Bild davon zu erhalten, wie die Besiedelung durch Bakterien eines Stammes auf Blattoberflächen aussehen könnte, wurde ein Inokulationsexperiment durchgeführt. Dazu wurde ein zuvor von *A. thaliana* isolierter Bakterienstamm durch Eintauchen in eine Inokulationslösung auf Blätter aufgebracht. Nach etwa vier Tagen Inkubation wurden diese in einer Glutaraldehydlösung fixiert. Beim Vorbereiten der Präparate für die elektronenmikroskopische Betrachtung wurde ein

Protokoll gewählt, bei dem durch ein spezielles Wasseraustauschverfahren kein Schrumpfen der Gewebe zustande kommt. Unsicher bleibt hierbei, inwieweit die Oberfläche der betrachteten Blattstücke noch der Realität entspricht, da bekannt ist, dass Ethanol, in welchem die Blattstücke bei der Vorbereitung wiederholt inkubiert wurden, Wachsbestandteile der Kutikula lösen kann. Jedoch konnten Zellen offensichtlich bakteriellen Ursprungs auch nach wiederholten Inkubationen in Ethanol auf den Blattstücken dokumentiert werden (Abb. 24).

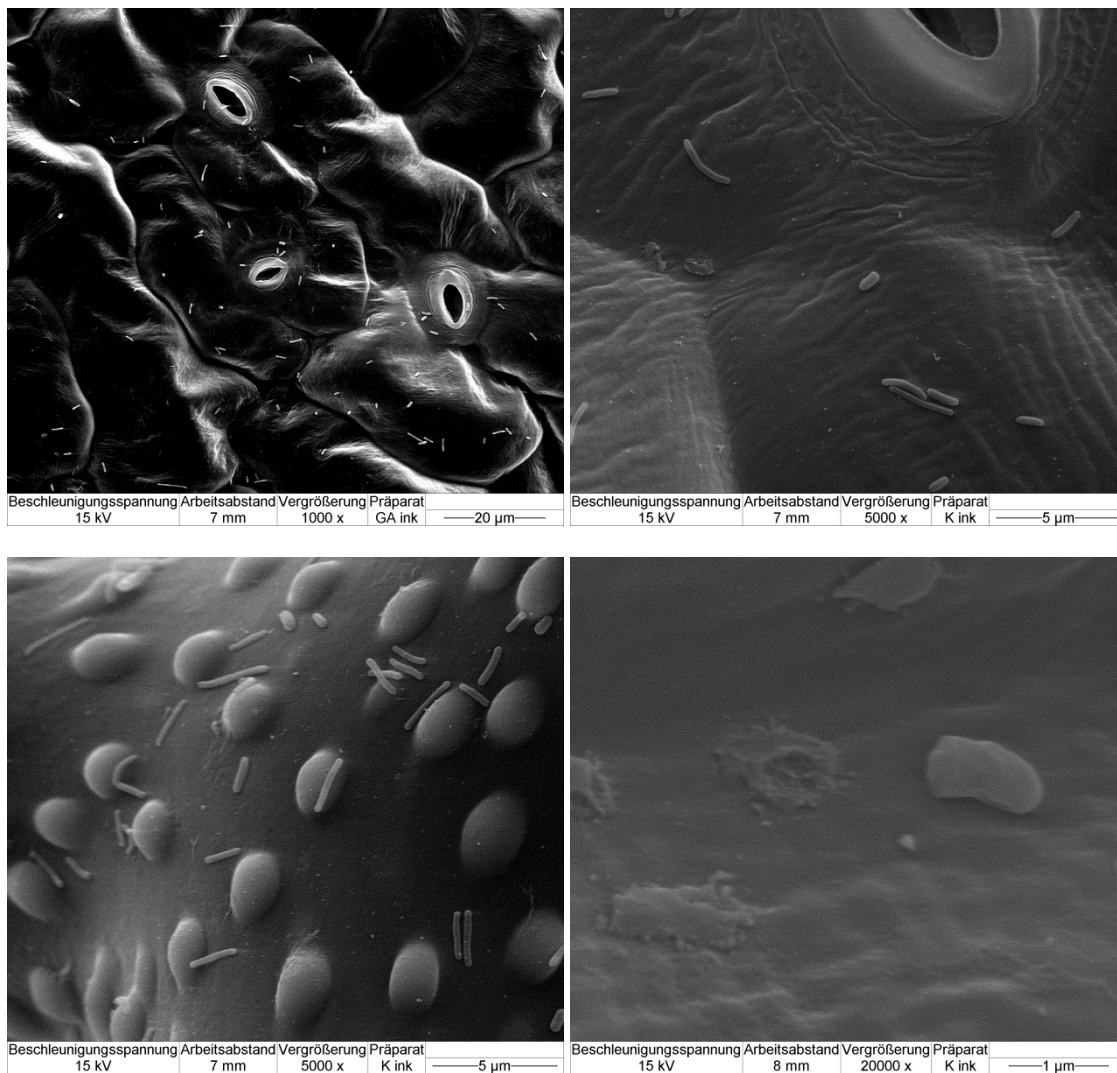


Abb. 24: Darstellung von Bakterien auf Blättern von *A. thaliana* Ler nach Wachstum im Klimaschrank und Inokulation mit dem Isolat Do5. Die Blätter wurden nach Fixierung in Glutaraldehyd-Puffern und einem Wasserentzugsprotokoll in einem Rasterelektronenmikroskop mit der jeweils angegebenen Vergrößerung betrachtet.

4.3 Einfluss von Trichomen auf die bakterielle Besiedelung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die bakterielle Besiedelung verschiedener *A. thaliana*-Linien im Hinblick auf den Einfluss struktureller Eigenschaften der Blattoberflächen untersucht. In diesem Projekt wurde untersucht, inwieweit die nicht drüsigen Haare auf den Blättern von *A. thaliana* einen Einfluss auf die bakterielle Besiedelung ausüben. Dazu wurde die bakterielle Besiedelung von Rosettenblättern einer Arabidopsis Wildtyp Accession (Col-0, Abb. 25A) mit der einer trichomlosen Mutante (*g/1*, Abb. 25B) verglichen. Es wurden einerseits Zellquantifizierungen in Blattabwaschsuspensionen vorgenommen sowie die Diversität der bakteriellen Besiedelung mithilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) untersucht.

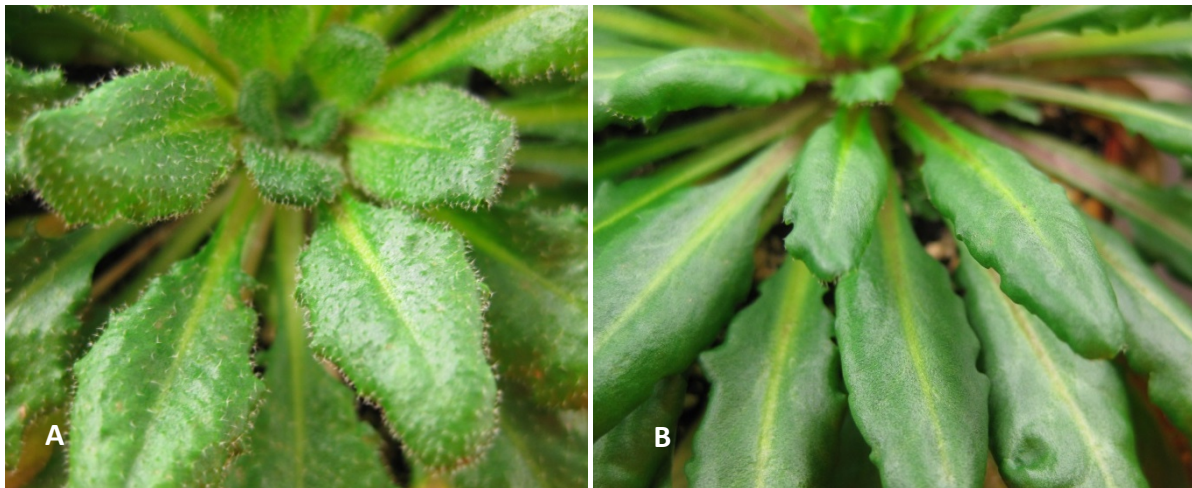


Abb. 25: Rosettenblätter der *A. thaliana*-Linien Col-0 (A) und *g/1* (B). Die Blattspreiten des Wildtyps sind vollständig behaart während die *g/1*-Linie lediglich am Blattrand Trichome aufweist.

4.3.1 Gesamtzellquantifizierung

Die von Col-0 bzw. *g/1*-Rosetten abgewaschenen Zellen wurden über DAPI-Gesamtzellzählungen quantifiziert. Dazu wurden die mit DAPI angefärbten Zellen in den Blattabwaschsuspensionen auf einen 0,2µm Filter aufgebracht und unter dem Epifluoreszenzmikroskop ausgezählt. Ob nach dem Blattabwasch Bakterien möglicherweise auf den Blättern zurückgeblieben waren, wurde nicht weiter untersucht.

Auf 8-11 Wochen alten Rosetten, die unter kontrollierten Klimabedingungen gewachsen waren, wurden im Mittel $8,9 \times 10^3 \pm 3,4 \times 10^3$ Zellen cm^{-2} Blattfläche auf Col-0 und $7,3 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$ Zellen cm^{-2} Blattfläche auf der *g/1*-Linie gefunden (Abb. 26). Die Zahlen schwankten zwischen $5,1 \times 10^3$ und $1,3 \times 10^4$ auf Col-0 und zwischen $4,0 \times 10^3$ und $9,9 \times 10^3$ auf *g/1* unabhängig davon ob die Pflanzen etwas jünger oder älter waren. Die große Standardabweichung bei den Zählungen kam durch die methodisch bedingten Multiplikationsschritte der eigentlichen Zählwerte zustande. Zudem wurden zunächst Mittelwerte aus den 10 Einzelzählungen je Filter gebildet mit denen wiederum die letztlichen Mittelwerte im Gesamtvergleich gebildet wurden. Ein Student's T-Test bestätigte die Unterschiede in den Zählwerten zwischen den Pflanzenlinien als nicht signifikant ($n=6-7$; $p = 0,350643$).

Auf etwa 12 Wochen alten Pflanzen, die eine vierwöchige Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten, zeigten sich bei der Gesamtzellquantifizierung deutlich höhere Werte im Vergleich zu den im Klimaschrank gewachsenen Pflanzen. Die Quantifizierung beruhte in diesem Fall auf drei biologischen Replikaten der jeweiligen Pflanzenlinien. Auf Col-0 fanden sich unter den betrachteten Replikaten im

Mittel $2,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$ Zellen cm^{-2} Blattfläche, auf der *g/1*-Linie wurden $4,9 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^4$ Zellen cm^{-2} Blattfläche gezählt. Die Ergebnisse schwankten zwischen $1,4 \times 10^4$ und $3,7 \times 10^4$ auf Col-0 sowie zwischen $3,2 \times 10^4$ und $6,7 \times 10^4$ auf *g/1*. Der statistische Vergleich mittels eines Student's T-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ($n=3$; $p=0,132917$).

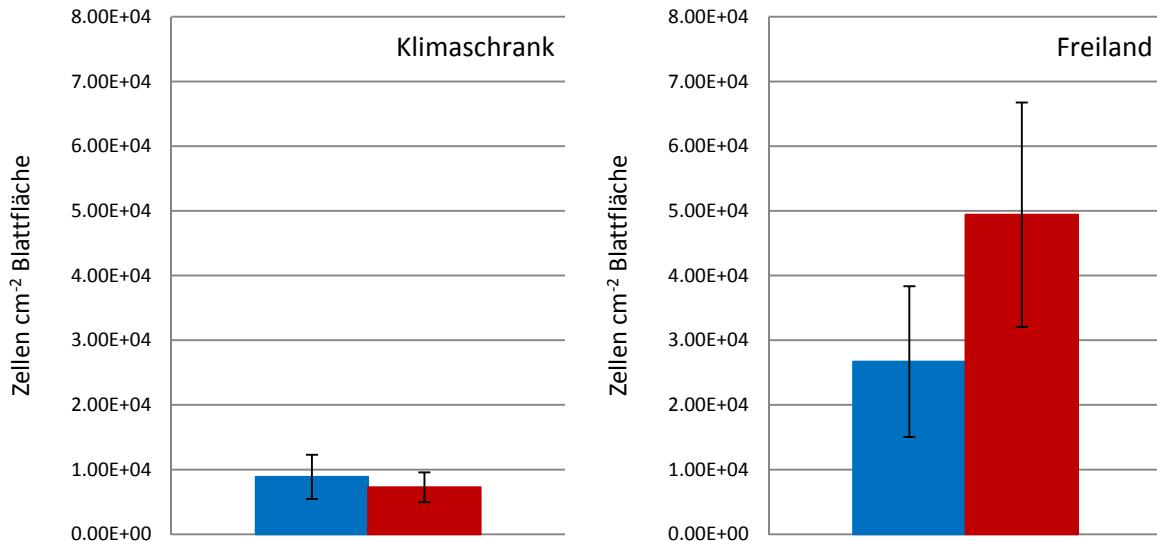


Abb. 26: Mittelwerte der Gesamtzellquantifizierungen von Rosettenabwaschproben von *A. thaliana* Col-0 (blau) bzw. *g/1*-Pflanzen (rot) die im Klimaschrank angezogen worden waren ($n=6-7$) oder eine Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten ($n=3$). Der statistische Vergleich der Gesamtzellwerte zwischen Col-0 und *g/1* zeigte für beide Kultivierungsmethoden keine Signifikanz (Student's T-Test).

4.3.2 DGGE-Analyse von klimaschrankangezogenen Pflanzen

Mittels DGGE wurden Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften auf *A. thaliana* Col-0- und *g/1*-Pflanzen verglichen. Hierfür wurden ebenfalls die von den Blättern abgewaschenen mikrobiellen Konsortien verwendet. In Abbildung 27 werden zwei repräsentative Gele gezeigt, die jeweils mehrere individuelle bakterielle Gemeinschaftsprofile von Col-0- und *g/1*-Pflanzen aus Klimaschrankanzucht enthalten (weitere Gele im Anhang, Abschnitt 7.7). Es wird deutlich, dass auch auf im Klimaschrank gewachsenen Pflanzen verschiedene bakterielle Phylotypen vertreten sind. Es fällt weiterhin auf, dass auf Gemeinschaftsprofilen einzelner Pflanzen Banden auftauchen, die auf keiner anderen Pflanze zu finden sind. Auch wird erkennbar, dass in Abbildung 27A die in drei Replikaten aufgetragenen PCR-Produkte in ihrer Bandenintensität zu variieren scheinen. Dieses ist dadurch zu begründen, dass auf diesem Gel kein ganzer PCR-Ansatz aufgetragen werden konnte und dadurch geringe Ungleichheiten der aufgetragenen Volumina auftraten. In Abbildung 27B sind die, aufgrund der größeren Taschen hier in gesamten Volumina aufgetragenen PCR-Replikate, sehr ähnlich. Im Hinblick auf den Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften von Col-0 und *g/1*-Pflanzen konnten keine pflanzenlinienspezifischen Unterschiede im Vorkommen bestimmter Banden erkannt werden.

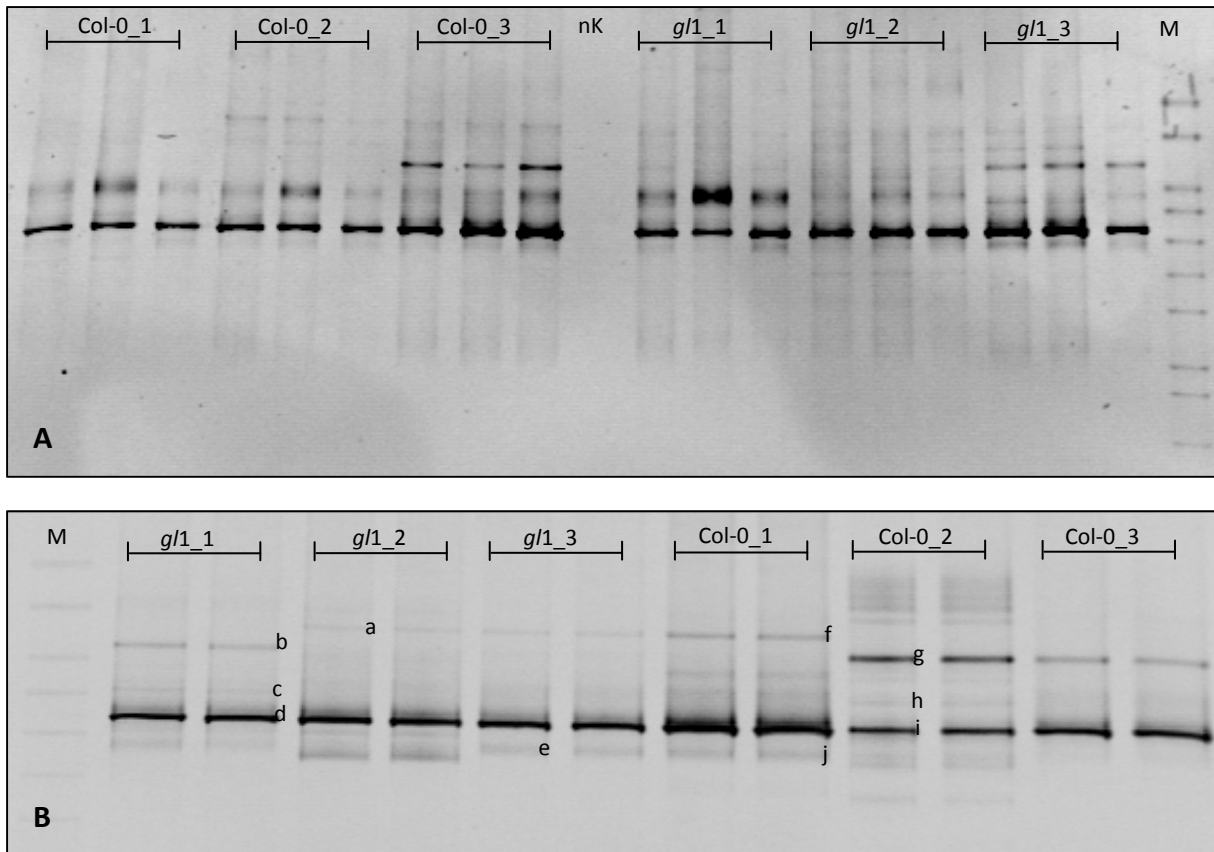


Abb. 27: DGGE-Profile von bakteriellen Gemeinschaftsprofilen im Klimaschrank gewachsener *A. thaliana* Col-0 und *g/1* im Vergleich. Pro individuellem Abwasch-Replikat wurden 2 (Abb.B) - 3 (Abb.A) unabhängige PCR-Ansätze als technische Replikate aufgetragen. Die biologischen Replikate die in beiden Abbildungsteilen gezeigt werden entsprechen einander nicht. In Abbildungsteil A wurde ein Gel mit 18 schmalen Taschen verwendet, in Abbildungsteil B ein Gel mit 13 breiteren Taschen in die ein gesamter PCR-Ansatz (42µl) geladen werden konnte. Zudem ist ein DGGE-Marker (M), dessen DNA-Fragmente bei fortschreitend höheren Gehalten der denaturierenden Substanzen denaturieren, auf beiden Gelen aufgetragen. Eine PCR-Negativkontrolle (nK), die keine Ausgangs-DNA enthielt, ist in Abbildungsteil A aufgetragen. Banden die ausgeschnitten und sequenziert wurden sind mit Kleinbuchstaben (a-j) rechts neben der Bande gekennzeichnet (siehe auch Tab. 5).

Zur weiteren Analyse der Bandenprofile (aus Abbildung 27B) wurde eine teilautomatisierte Bildanalyse-Software (Quantity One® 1-D Analysis Software; siehe Abschnitt 3.5.6) verwendet. Es wurden dabei auf den Gelbildern alle Banden markiert und hinsichtlich ihrer Laufhöhe zwischen den einzelnen Spuren (also den Einzelgemeinschaftsprofilen) verglichen. Anschließend konnte ein Dendrogramm, welches Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Profilen hinsichtlich der An- und Abwesenheit von Banden auf gleicher Höhe darstellte, von der Software erstellt werden. In Abbildung 28 wird das Dendrogramm, das aus Abbildung 27B resultierte, dargestellt. Mithilfe der QuantityOne®-Software bestätigte sich der optische Eindruck, insofern als die Profile der biologischen Replikate relativ geringe Ähnlichkeit zueinander aufwiesen (52% - 89% Ähnlichkeit, technische Replikate im Vergleich zwischen 95% und 98%). Auch ließen sich keine pflanzenlinienspezifischen Cluster erkennen.

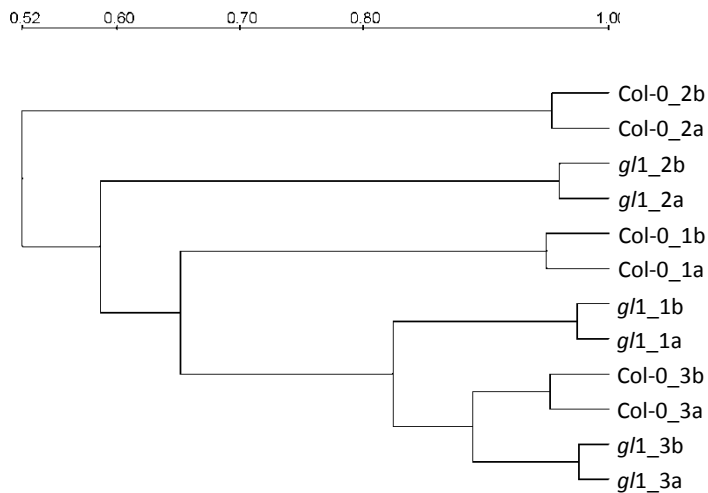


Abb. 28: QuantityOne®-Dendrogramm der bakteriellen Profile. Es wurde die An- bzw. Abwesenheit von Banden, nicht aber deren Intensität berücksichtigt. Die Datengrundlage bildet Abb. 27B, die beiden technischen Replikate jeder Probe sind mit a und b bezeichnet. Der verwendete Clustering-Algorithmus war die UPGMA-Methode (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) zusammen mit dem Dice-Ähnlichkeitsmaß.

Weiterhin wurden aus dem in Abbildung 27B gezeigten Gel alle mit Kleinbuchstaben markierten Banden ausgeschnitten, die darin enthaltene DNA eluiert, reamplifiziert und kloniert. Daraufhin wurden je Bande 9 Klone gepickt, mittels RFLP durchmustert und jeweils 2-3 Klone mit zum Teil unterschiedlichem RFLP-Muster sequenziert. Hiermit wurde auf eine Limitation der DGGE reagiert, bei der sich DNA mit Sequenzunterschieden aber ähnlichen Schmelzeigenschaften in einer Bande sammeln kann. Alle erhaltenen Bandensequenzen wurden mittels BLAST-Analyse bakteriellen Phylotypen zugeordnet (Tab. 5). Dabei wurde die eine dominante Bande, die in allen Profilen auftrat hauptsächlich *A. thaliana*-Chloroplasten zugeordnet. Weitere Sequenzen, die große Ähnlichkeit zu Chloroplasten aufwiesen waren in anderen Banden (a, c, h, j) ebenfalls enthalten, was auf einen hohen Gehalt an Chloroplastenamplifikaten insgesamt hindeutet. Weitere Sequenzen wurden Mitochondrien zugeschrieben. Außerdem wurde erkennbar, dass alle Banden, die sowohl auf der Col-0 als auch auf der *g/1*-Linie auftraten und auf gleicher Höhe liefen, den gleichen bakteriellen Phylotyp enthielten. Es wurden also sowohl auf Col-0 als auch auf *g/1*-Pflanzen Phylotypen gefunden die der Gattung *Dyadobacter*, der Familie der Sphingomonadaceae und einem bestimmten, nicht näher klassifizierten unkultivierten Bakterium zugeordnet wurden. Damit wurde deutlich, dass hinsichtlich der bakteriellen Diversität kaum Unterschiede zwischen den verglichenen Pflanzenlinien gefunden wurden.

Tabelle 5: Tabelle mit den besten BLAST-Hits der klonierten und sequenzierten Banden aus Abb. 27B. Banden in grauer Schrift sind pflanzlicher Herkunft (Mitochondrien oder Chloroplasten). Der E-Wert war in allen Fällen null.

Klon	Sequenzlänge (bp)	Bester BLAST-Hit (Accessionsnummer)	Sequenzähnlichkeit
a1	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	99%
a2	588	Uncultured bacterium clone ncd553f08c1 (HM278326.1)	99%
a3	575	<i>Flexibacteraceae</i> bacterium CH30#7 (EU057829.1)	98%
b1, b2	578	<i>Dyadobacter beijingensis</i> strain A54 (DQ335125.1)	99%
c1	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	99%
c2	561	Uncultured Sphingomonadaceae bacterium clone SLB-70 (FJ028669.1)	98%
c3	586	<i>Herbaspirillum</i> sp. TSA59 (AB572349.1)	97%
d1, d2	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	100/99%
e1, e2	561	<i>A. thaliana</i> ecotype Col-0 mitochondrion (JF729201.1)	99%
f2, f3	588	Uncultured bacterium clone ncd553f08c1 (HM278326.1)	99%
g1, g2	578	<i>Dyadobacter beijingensis</i> strain A54 (DQ335125.1)	99%
h1	561	Uncultured Sphingomonadaceae bacterium clone SLB-70 (FJ028669.1)	98%
h2	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	100%
i1	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	99%
i2	585	<i>Achromobacter</i> sp. enrichment culture clone B-13 (HM071055.1)	100%
i3	585	<i>Comamonadaceae</i> bacterium b4M (EF540485.1)	99%
j1	560	<i>A. thaliana</i> ecotype Col-0 mitochondrion (JF729201.1)	99%
j2	564	<i>A. thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	99%

Weiterhin wurden die Profile von Blattabwaschproben mit Profilen von Substratproben aus den Anzuchttöpfen und Blattabwaschproben steril angezogener Pflanzen verglichen (Abb. 29). Hierbei wird deutlich, dass die Substratprofile wesentlich diverser als die Profile auf den im Klimaschrank gewachsenen Pflanzen sind. Die Proben von steril angezogenen Pflanzen weisen lediglich eine dominante Bande und einige schwache Schlieren auf. Im weiteren Verlauf wurden diese Banden ausgeschnitten und sequenziert, um ihre Herkunft zu klären. Es zeigte sich, dass alle ausgeschnittenen Banden aus Profilen von steril angezogenen Pflanzen starke Sequenzähnlichkeiten zu *A. thaliana*-Chloroplasten aufwiesen.

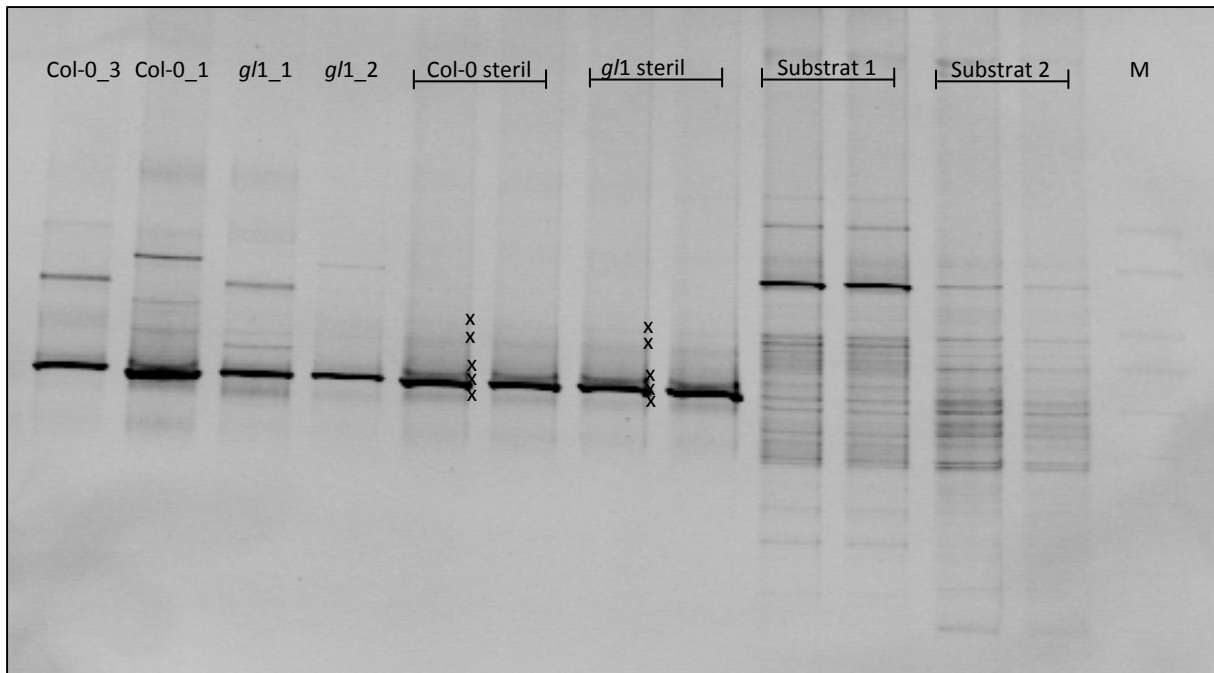


Abb. 29: DGGE-Profile von im Klimaschrank gewachsenen (Col-1, *g/1*) und steril angezogenen Pflanzen (Col-0 steril, *g/1* steril) sowie Substratproben (Substrat 1,2). Es wurden die gekennzeichneten Banden kloniert und sequenziert. Sie wurden alle mit großer Ähnlichkeit Chloroplastensequenzen zugeordnet. Banden die ausgeschnitten und sequenziert wurden sind mit einem x rechts neben der Bande gekennzeichnet. Die auf dem Gel enthaltenen Col-0 und *g/1*-Replikate, die zum Vergleich mit den steril angezogenen Rosetten aufgetragen wurden, entsprechen den in Abbildung 27B gezeigten Replikaten.

4.3.3 DGGE-Analyse nach Freilandwachstumsperiode

Auch nach einer vierwöchigen Freilandwachstumsperiode wurden die Bakteriengemeinschaften auf den Blättern der beiden *A. thaliana*-Linien untersucht. Nach dem Freilandaufenthalt schienen die Pflanzen phänotypisch an die Außenbedingungen angepasst (ähnlich Abb. 5C), d.h. ihre Blätter waren leicht verdickt und hatten stellenweise eine rötliche Färbung angenommen. Zudem hatten die Pflanzen Blütenstände entwickelt, die in der Anfangsphase der Blüte standen, also noch keine Schoten entwickelt hatten. Für die Untersuchungen wurden nur Rosettenblätter verwendet, die augenscheinlich gesund und turgeszent waren und keine trockenen Stellen, Verletzungen oder gelbliche Verfärbungen aufwiesen, die auf eine beginnende Seneszenz hingedeutet hätten.

Für die Untersuchung der bakteriellen Gemeinschaften wurden wiederum DGGE-Profile von vier Pflanzenindividuen je Pflanzenlinie erstellt (Abb. 30A). Die erhaltenen Muster waren einander, unabhängig von der Pflanzenlinie sehr ähnlich. Es waren auch individuelle Unterschiede zu erkennen, die sich aber nicht auf eine der beiden Pflanzenlinien beschränkten. Auch die softwaregestützte Bildanalyse ergab, dass die Proben, die von einer Pflanzenlinie stammten zueinander nicht ähnlicher waren, als die Proben der anderen Pflanzenlinie (Abb. 30B). Die Untersuchung war im darauffolgenden Jahr mit ähnlichen Resultaten wiederholt worden (siehe Anhang 7.7).

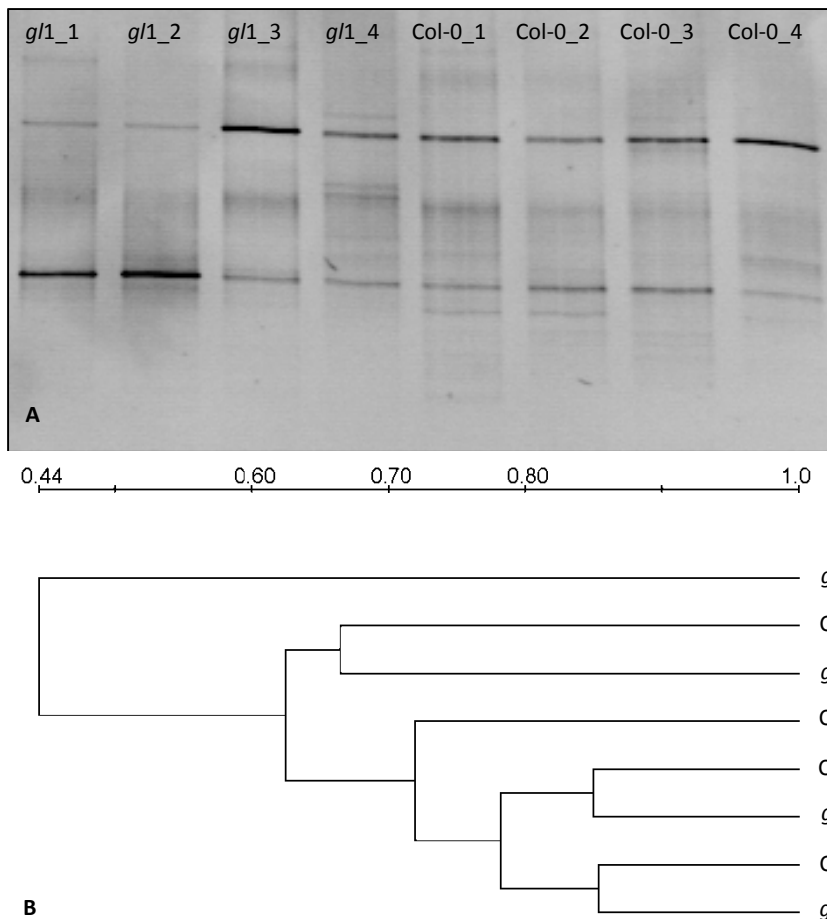


Abb. 30: DGGE-Profile von bakteriellen Gemeinschaften auf *A. thaliana* Col-0 bzw. *g/1* nach Freilandwachstumsperiode (A). Es sind je Pflanzenlinie vier biologische Replikate aufgetragen. Die softwaregestützte Bildauswertung ergab keine klaren Ähnlichkeiten zwischen den Replikatpflanzen einer Pflanzenlinie (B). Der verwendete Clustering-Algorithmus war die UPGMA-Methode (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) zusammen mit dem Dice-Ähnlichkeitsmaß.

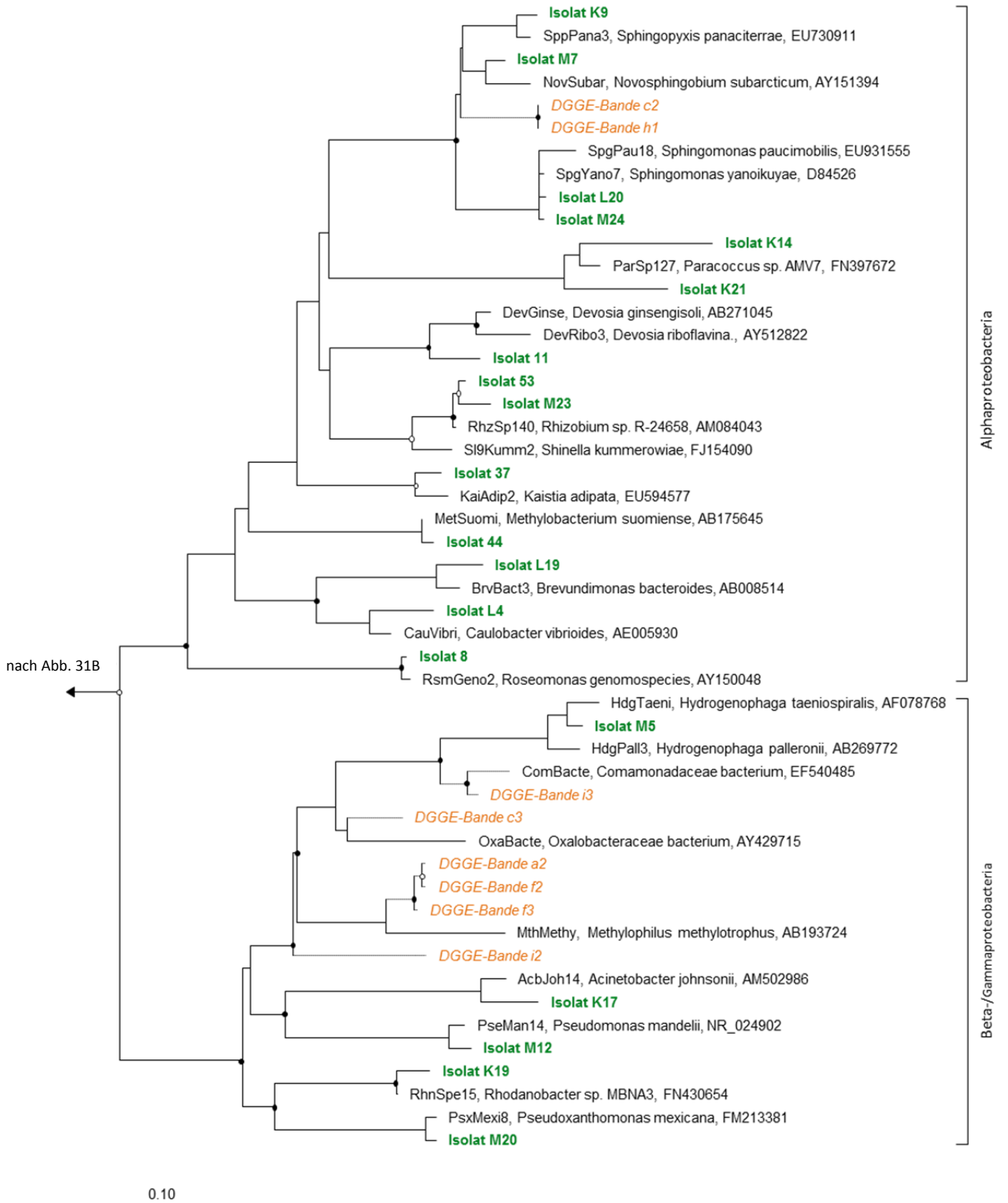
4.3.4 Phylogenetische Einordnung

Zum Abgleich der über die DGGE-Analyse nachgewiesenen Phylotypen und einigen, in 4.2.1 beschriebenen Isolaten, wurde ein phylogenetischer Baum errechnet (Abb. 31A,B). Ziel war es zu erkennen, ob man durch die Kultivierung von Bakterien auch die Phylotypen erfasst, die die hauptsächlich in den bakteriellen Gemeinschaften vorliegenden Phylotypen darstellen. Es wurde deutlich, dass zum Teil ähnliche Phylotypen in den kultivierten Isolaten und in der DGGE vorlagen. So wurden die DGGE-Banden c1 und h1 in „die Nähe“ der Isolate M7 und K9 gestellt und auch die Bande i3 und das Isolat M5 wurden nicht weit voneinander in den Baum eingeordnet. Dennoch wurden Cluster von DGGE-Banden beobachtet (Bande a2, f2, f3 und Bande b1, b2, g1, g2) bei denen kein kultivierbarer Vertreter als phylogenetisch nah verwandt angesehen werden konnte.

Ein weiterer Zweck war die Überprüfung der Verwandtschaftsnähe der in der DGGE auf beiden Pflanzenlinien gefundenen Phylotypen. Hier konnten die Ergebnisse der BLAST-Analysen bestätigt werden. So wurde neben individuell auftretenden Phylotypen (z.B. Bande i2 und a3) die gleiche Identität der einander entsprechenden Banden in den Profilen beider Pflanzenlinien wiedergefunden. Bande c1 entspricht hier dem Phylotyp der Bande h1, ebenso werden die Banden a2 und f2 sowie b1, 2 und g1, 2 in ein enges Verwandtschaftsverhältnis eingeordnet. Die in der

BLAST-Tabelle (Tab. 5) aufgeführte ähnlichste Sequenz zur Bandensequenz a2, f2 und f3 stammte von einem nicht näher klassifizierten unkultivierbaren Bakterium. Im Baum konnten die Banden in die Nähe einer Referenzsequenz der Gattung *Methylophilus* eingeordnet werden.

Insgesamt wird deutlich, dass offenbar die durch DGGE ermittelten Phylotypen dieser minimalen *A. thaliana*-Besiedelung aus dem Klimaschrankexperiment eine vergleichsweise geringe Diversität aufwiesen. Diese unterscheidet sich nicht im Vergleich der Col-0 und der *g/1*-Linie. Im Vergleich dazu scheint die Kultivierung eine höhere Diversität zu erfassen, die beiden analysierten Teile der Mikrobiome überlappen zudem nicht vollständig. So werden trotz geringerer Diversität mit der DGGE offensichtliche Hauptmitglieder der bakteriellen Gemeinschaft erfasst, die nicht mit den in dieser Arbeit erprobten Kultivierungsmethoden erfasst werden konnten.



A

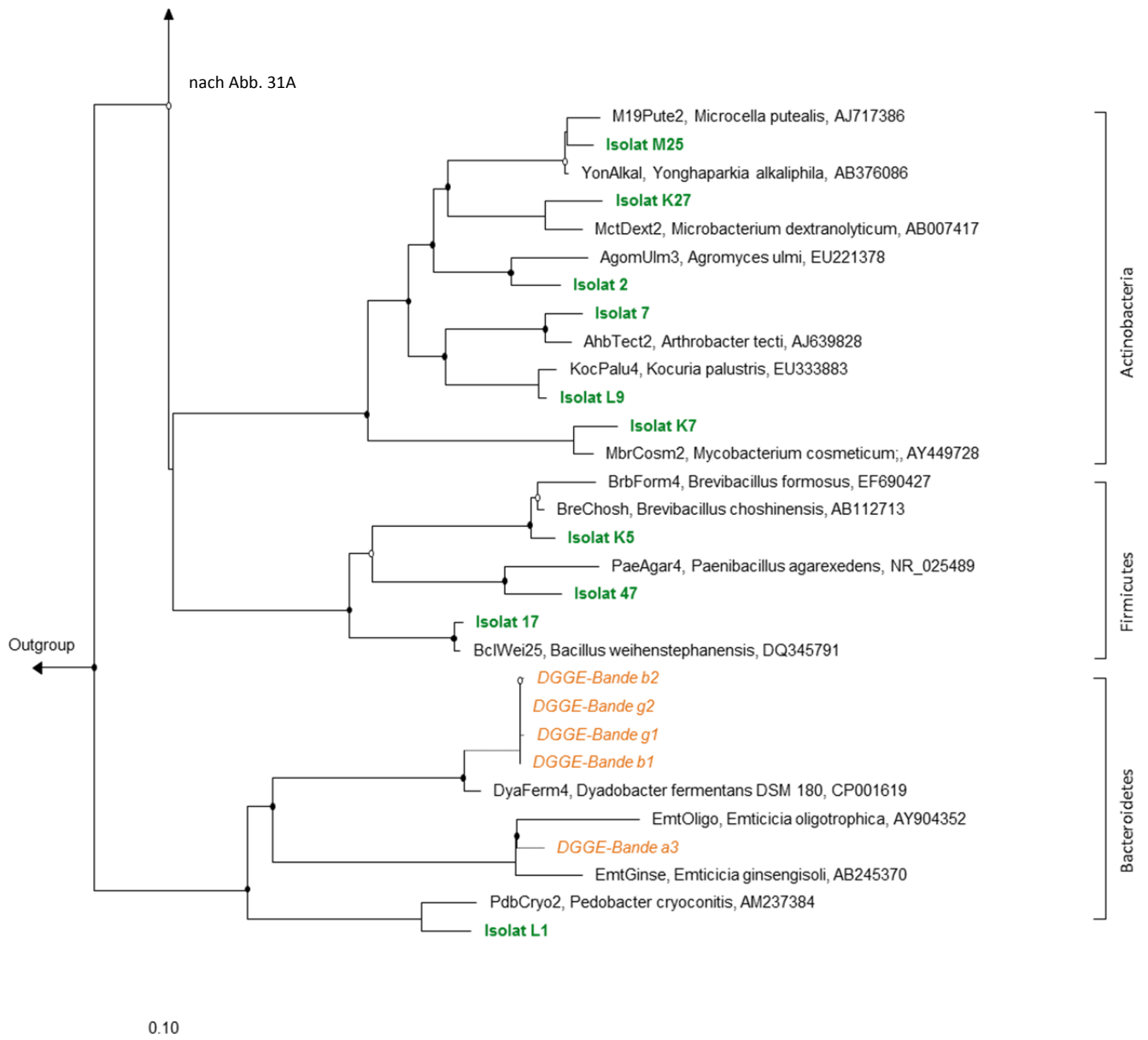
**B**

Abb. 31A/B: Phylogenetischer Baum des 16S SSU rRNA-Gens ausgewählter Isolate (nahezu Vollängensequenzen), Referenzsequenzen aus GenBank sowie DGGE-Teilsequenzen und Referenzsequenzen. Es wurde die „maximum likelihood“-Methode mit 1000 Wiederholungen verwendet. Einige Sequenzen der Archaeobakterien dienten als Outgroup.

4.4 Einfluss von kutikulärer Wachszusammensetzung auf die bakterielle Besiedelung

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit sich die Zusammensetzung der kutikulären Wachse von *A. thaliana*-Blättern auf deren bakterielle Besiedelung auswirkt. Es sollte beleuchtet werden, ob eine veränderte chemische Wachszusammensetzung und die möglicherweise damit einhergehenden Veränderungen auch eine veränderte bakterielle Besiedelung bewirken könnten. Da Bakterien auf pflanzlichen Oberflächen von kutikulären Wachsen der Pflanze umgeben sind und diese auch als erste Kontaktfläche fungieren, könnten die physiko-chemischen Eigenschaften der Kutikula auch einen Einfluss auf die An- oder Abwesenheit bestimmter bakterieller Gruppen ausüben.

Die Experimente wurden mit mutageneseinduzierten, stabilen Mutanten des *A. thaliana* Ler-Wildtyps durchgeführt. Es wurden aus der Kollektion der sogenannten *eceriferum*-Mutanten (Koorneef et al. 1989), die sich durch einen grünlänzenden Stängel auszeichneten, vier Mutanten ausgewählt. Nach publizierten Daten (Jenks et al. 1995) wiesen diese neben ihren Stängelwachsen auch auf ihren Blättern kutikuläre Wachse auf, die sich deutlich vom Wildtyp in Komposition und Menge unterschieden. Es wurden für die Versuche Pflanzen verwendet, die eine Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten, da hier, wie unter Punkt 4.4.1 beschrieben wird, eine größere Anzahl von Bakterien im Vergleich zur Klimaschrankanzucht vorhanden war. Zudem wurde vermutet, dass die Besiedelung im Freiland aus naturnahen Quellen wie Regen-, Wind- oder Insekteneintrag, erfolgte.

4.4.1 Quantifizierung von Bakterien

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, wie sich die bakterielle Besiedelung quantitativ auf Pflanzen im Klimaschrank und während der Freilandwachstumsperiode auf den ausgewählten Pflanzenlinien entwickelte. Dazu wurden Gesamtzellzählungen nach DAPI-Färbung durchgeführt und auf 0,1xLB-Medium kultivierbare Bakterien quantifiziert. Für diese Quantifizierungen wurden alle verwendeten Pflanzen einer Anzuchtcharge (im Frühjahr 2012) entnommen. Je 3-4 biologische Replikate wurden nach acht Wochen Klimaschrankanzucht (direkt vor dem Transferieren der Pflanzen ins Freiland) untersucht. Weitere Zählungen wurden an Pflanzen nach der vierwöchigen Freilandwachstumsperiode durchgeführt und außerdem Pflanzen betrachtet, die 14 Wochen nur im Klimaschrank kultiviert worden waren.

Es wurde beobachtet, dass die im Klimaschrank gewachsenen Pflanzen nach 8 Wochen eine geringe Zahl Bakterien akquiriert hatten (Abb. 32). Die Gesamtzellzahlen beliefen sich zu diesem Zeitpunkt auf $8,2 \times 10^3$ bis $1,8 \times 10^4$ Zellen cm^{-2} Blattfläche. Kultiviert werden konnten $6,3 \times 10^1$ bis $4,4 \times 10^2$ Kolonien bildende Einheiten pro cm^{-2} Blattfläche. Varianzen von zum Teil bis zu einer Größenordnung traten zwischen einzelnen Pflanzenreplikaten auf, ließen sich aber nicht auf einzelne Pflanzenlinien beziehen.

Nach der Freilandwachstumsperiode war eine stark erhöhte Zahl von Bakterien auf den Rosettenblättern der Pflanzen vorhanden (Abb. 32). So wurden Gesamtzellzahlen zwischen $2,7 \times 10^5$ und $6,3 \times 10^5$ Zellen cm^{-2} Blattfläche ermittelt. Auf 0,1xLB-Medium konnten zwischen $9,8 \times 10^3$ und $4,9 \times 10^4$ Kolonien cm^{-2} Blattfläche kultiviert werden. Alle ermittelten Werte waren signifikant höher als die vor der Freilandperiode erhobenen Daten nach 8 Wochen Klimaschrankanzucht. Im Vergleich der *cer*-Mutanten mit dem Wildtyp ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl nachgewiesener Bakterien. Als einzige Ausnahme konnten auf der *cer9*-Linie signifikant weniger kultivierbare Bakterien als auf dem Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 32).

Nach 14 Wochen reiner Klimaschrankanzucht wurden lediglich geringfügig erhöhte Bakterienzahlen im Vergleich zum Zeitpunkt nach 8 Wochen festgestellt (Abb. 32). Auf *cer1*, *cer6* und *cer16* wurden etwa zwei bis dreifach erhöhte und auf dem Wildtyp um etwa die Hälfte erniedrigte Gesamtzellzahlen ermittelt. Auf der *cer9* Linie zeigte sich ein etwa fünffacher Anstieg der Gesamtzellzahl. Diese Veränderungen waren aber, bis auf die der *cer16* Linie, nicht signifikant. Hinsichtlich der kultivierbaren Bakterien zeigte sich nach 14 Wochen auf allen Mutanten ein geringer, nicht signifikanter Anstieg auf $2,3 \times 10^2$ bis $6,2 \times 10^3$ Kolonien cm^{-2} Blattfläche. Auf dem Wildtyp wurde jedoch wiederum ein Rückgang beobachtet (auf $4,9 \times 10^1$ Kolonien cm^{-2} Blattfläche). Im Vergleich aller Bakterienzahlen der Mutanten mit dem Wildtyp wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

In der Gesamtbetrachtung wurde klar, dass sich auf den Pflanzen während der Freilandperiode wesentlich mehr Bakterien angesiedelt hatten, als das im Klimaschrank der Fall war. Es wurden insgesamt hohe Schwankungsbreiten zwischen den einzelnen Replikaten beobachtet, die zum einen technisch bedingt waren, aber auch für das Habitat spezifisch zu sein scheinen. Ergebnisse die von *A. thaliana* Col-0 und der *gl1*-Mutante nach Freilandperiode gewonnen wurden (Abschnitt 4.3.1) zeigten Zellzahlen, die um etwa eine Größenordnung geringer waren, als die hier beschriebenen. Auch Gesamtzellzahlen, die nach der Freilandperiode 2011 von den Wachsmutanten ermittelt wurden (für die aber keine Vergleichswerte zu im Klimaschrank kultivierten Pflanzen existieren), liegen mit $1,8 \times 10^4$ (*cer1*) bis $8,3 \times 10^4$ (Ler) deutlich unter den hier für 2012 dargestellten Werten. Es scheinen also starke Schwankungen von Jahr zu Jahr möglich zu sein.

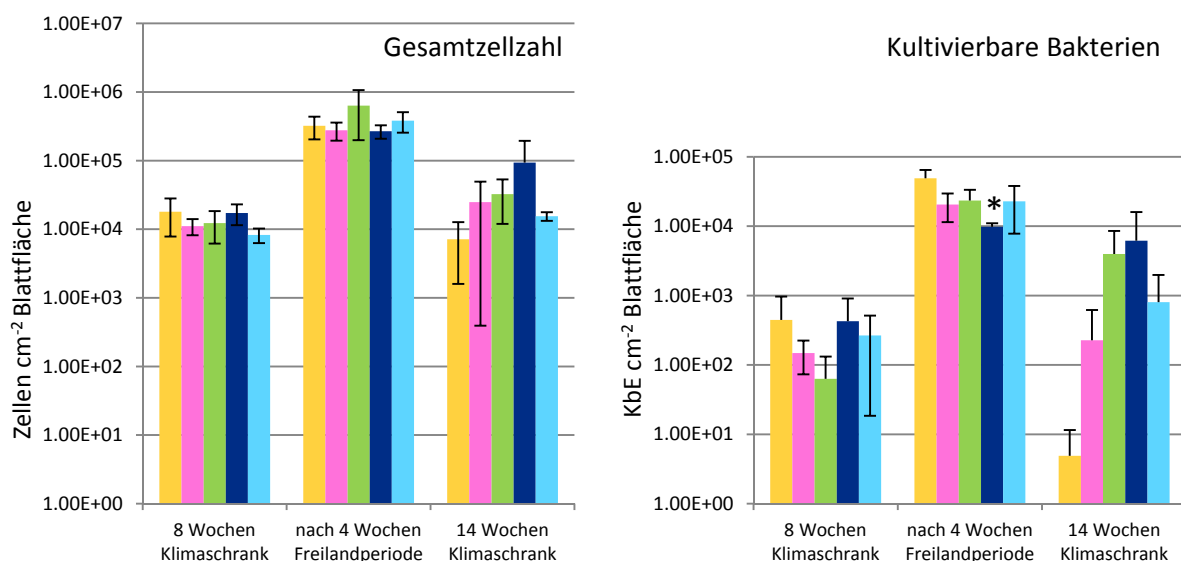


Abb. 32: Gesamtzellzahlen [Zellen cm^{-2} Blattfläche] und auf 0,1xLB-Medium Kolonien bildende Einheiten [KbE cm^{-2} Blattfläche] von mikrobiellen Phyllosphärengemeinschaften ausgewählter Wachsmutanten (*cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16*) und des Ler Wildtyps nach 8 Wochen Klimaschrankanzucht ($n=3-4$), nach weiteren 4 Wochen Freilandwachstumsperiode ($n=3$) und 14 Wochen Klimaschrankanzucht ($n=3$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den kultivierbaren Einheiten auf dem Wildtyp und den unterschiedlichen Mutanten wurde mithilfe eines Student's T-Tests ermittelt und ist mit einem * gekennzeichnet. Weitere statistische Vergleiche (zwischen kultivierten Bakterien und Gesamtzellzahlen sowie zwischen den verschiedenen Pflanzenanzuchtmethoden) sind im Text dargestellt und in Tabelle L im Anhang 7.6 zu finden. Farbcodierung: orange: Ler, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*.

4.4.2 Stabilität der Besiedelung des Wildtyps

Zur Untersuchung der Stabilität der mikrobiellen Konsortien von *A.thaliana* nach Freilandwachstumsperiode wurden Proben der Wildtyp-Replikate der Jahre 2010 und 2011 nebeneinander auf ein DGGE-Gel aufgetragen (Abb. 33). Aus den Bandenmustern wurden Banden ausgeschnitten und mittels Klonierung und Sequenzierung die entsprechenden Phylotypen identifiziert.

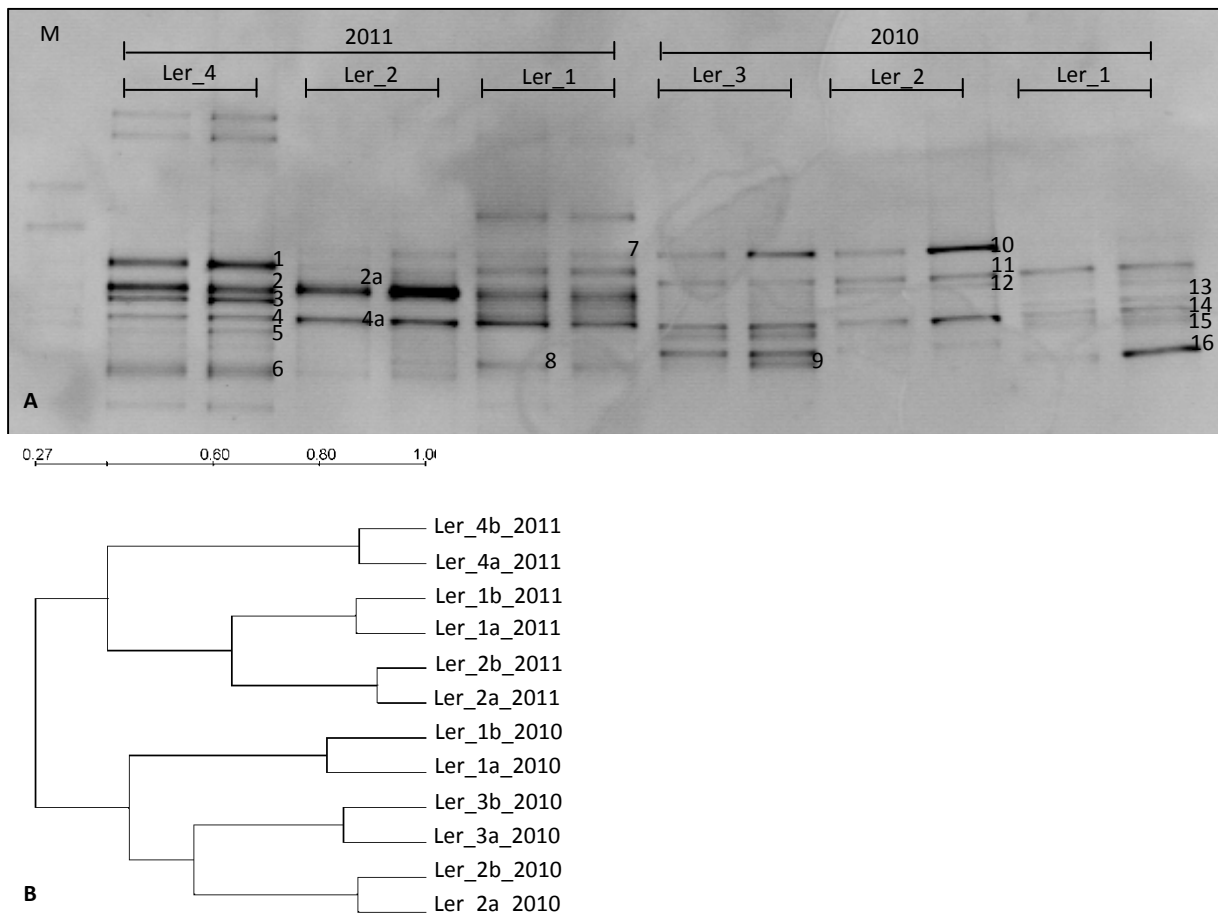


Abb. 33: DGGE-Gel bakterieller Gemeinschaften in der Phyllosphäre von drei Wildtyp (Ler)-Individuen nach Freilandwachstumsperioden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren (A) und das Ergebnis der softwaregestützten Bildanalyse (B). Die im Gelbild mit Zahlen markierten Banden wurden für eine Identifizierung ausgeschnitten und kloniert. Die angegebenen Replikatanummerierungen entsprechen den in Abschnitt 4.4.3 und 4.4.4 beschriebenen. Mit „M“ ist die Markerspur bezeichnet.

Schon auf den ersten Blick zeigt sich, dass die Bandenmuster der aus dem Jahr 2011 stammenden Proben sich von denen aus 2010 unterschieden. Das bestätigte auch die softwaregestützte Bildanalyse (Abb. 33B). Bande 7 und 10, Bande 4, 4a und 14 sowie Bande 8 und 16 scheinen etwa auf gleicher Höhe zu laufen. Andere Banden z.B. auf Höhe der Bande 1, 3, 11, 13, 15/15a treten in den Proben eines Jahres auf allen Individuen auf, jedoch nicht in den Proben des anderen Jahres. Aus dem Gel wurden prominente Banden, die sich in den Bandenmustern mehrerer Individuen zumindest eines Jahres fanden, ausgeschnitten, kloniert und 2-3 Klone je Bande sequenziert. Das Ergebnis ist in Tabelle 6 dargestellt. Es zeigte sich, dass auch bei den Banden auf gleicher Höhe kaum Übereinstimmung der Sequenzen in den Proben der beiden Jahre besteht. Lediglich bei den Banden 4/4a und 14 sowie 8 und 16 zeigen sich Übereinstimmungen. Die Banden 4/4a und 14 enthielten neben nicht übereinstimmenden Sequenzen *A. thaliana* Chloroplastensequenzen. Sequenzen der

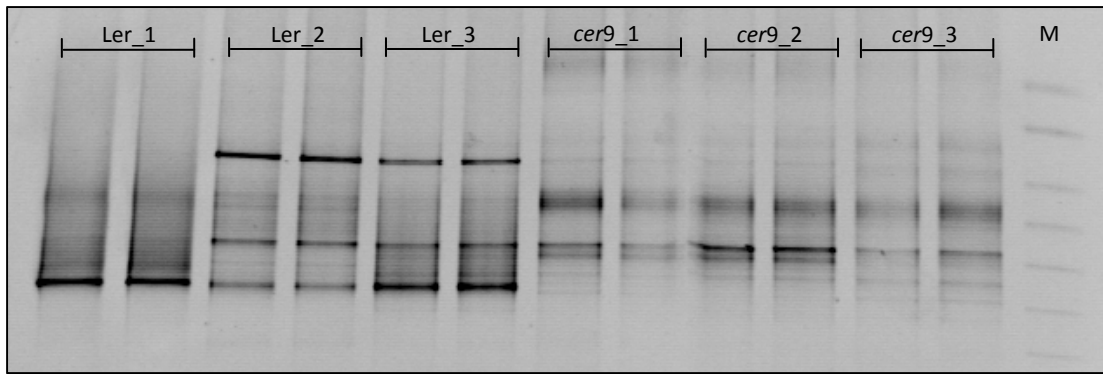
Banden 8 und 16, wurden unter anderem *Methylobacterium* zugeordnet. Weitere Übereinstimmungen wurden zwischen den Banden 6 und 16 sowie 1,7 und 15 gefunden, obwohl sich diese Banden nicht auf gleicher Höhe befanden. Im Fall der Banden 6 und 16 sowie 1 und 7 könnte eine unvollständige Trennung der Banden vorgelegen haben, da sie immerhin in räumlicher Nähe zueinander auftraten. Im Fall der Bande 15, bei der ein Klon starke Ähnlichkeit zum gleichen BLAST-Hit wie Bande 1 aufwies, könnte es sich um eine technisch bedingte Kontamination oder unzureichende Fokussierung der Bande handeln. Weiterhin ist zu betonen, dass die Sequenzierung der ersten zwei bis drei Klone der jeweiligen re-amplifizierten Bande auch Spielraum für Ungenauigkeiten birgt. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass die bakteriellen Gemeinschaften, die sich während der Freilandwachstumsperiode eines Jahres auf dem Ler Wildtyp gebildet haben, innerhalb der Replikate dieses Jahres ähnlich waren. Sie unterschieden sich jedoch von den Bandenmustern des zweiten Jahres. Dieser optische Eindruck wurde durch die Identifizierung der Phylotypen bestätigt.

Tabelle 6: Auflistung der besten BLAST-Hits zu den Bandensequenzen aus Abb. 33. In der zweiten Spalte werden die Bande und die jeweils daraus sequenzierten Klone angegeben – 1,2,3 entspricht also allen drei Klonen einer Bande. Der e-Wert für alle BLAST-Hits betrug 0. Sequenzen, die *A. thaliana*-Chloroplasten zugeordnet werden konnten, sind in grauer Schrift dargestellt.

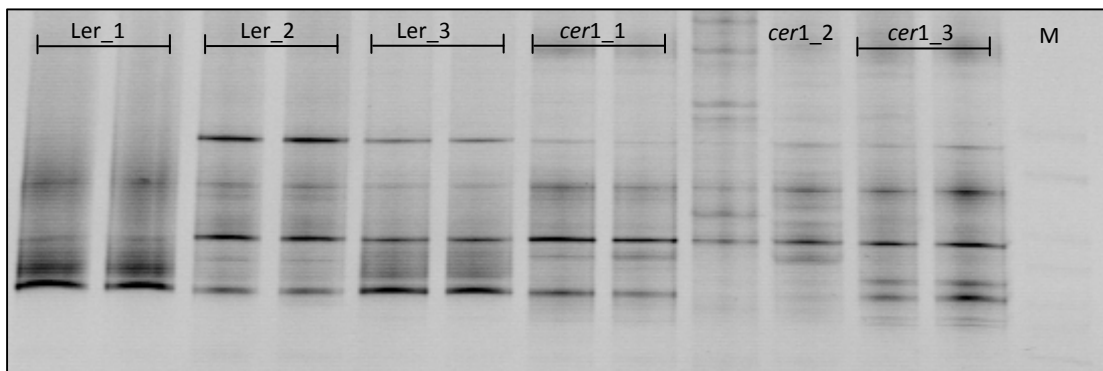
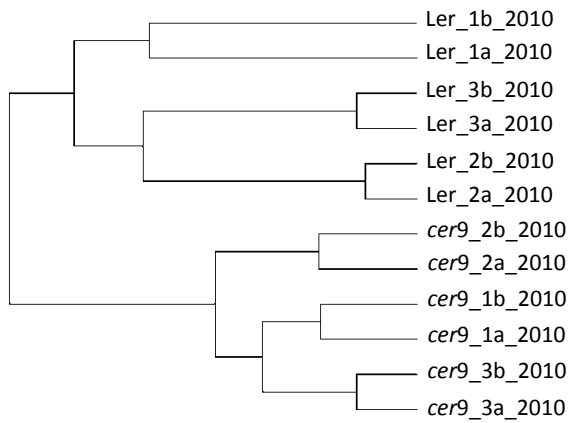
	Bande/Klon	Sequenzlänge	Bester BLAST-Hit (Accessionsnummer)	Sequenzähnlichkeit
2011	1/1,2,3	561	Uncultured bacterium clone nbw362a08c1 (GQ076207.1)	99%
	2/2,3	560	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain S_S_TSA_10 (KC213941.1)	100%
	2a/1	561	Uncultured bacterium clone CK_2C5_7 (EU488438.1)	96%
	2a/2,3	560	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain S_S_TSA_10 (KC213941.1)	100%
	3/1,2,3	585	Uncultured bacterium clone nbw1231h01c1 (GQ079607.1)	99%
	4/1,3	564	<i>Arabidopsis thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	100%
	4/2	577	Uncultured bacterium clone SINI951 (HM127263.1)	99%
	4a/1,2,3	564	<i>Arabidopsis thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	100/99%
	5/1,2,3	587	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> strain W8 (KC840826.1)	100%
	6/1,2,3	560	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NR_102897.1)	100%
	7/1	561	Uncultured bacterium clone nbw362a08c1 (GQ076207.1)	99%
	7/2,3	579	Uncultured bacterium clone ncd2020g11c1 (JF175004.1)	99%
	8/1	560	Uncultured <i>Methylobacterium</i> sp. (KC011139.1)	100%
	8/2	561	Uncultured bacterium clone V201-102 (HQ114117.1)	99%
	2010	9/1	561	Uncultured bacterium (JF218090.1)
9/2,3		586	<i>Pantoea vagans</i> C9-1 (NR_102966.1)	100%
10/1,2,3		585	<i>Massilia aurea</i> strain A47 ZO-27 (KC788085.1)	100%
11/1,2,3		578	<i>Fibrella aestuarina</i> BUZ 2 (NR_102471.1)	98%
12/1		585	Uncultured bacterium (HM363275.1)	98%
12/2		578	Uncultured bacterium (JF210938.1)	100%
12/3		585	<i>Variovorax</i> sp. B25 (KC693707.1)	100%
13/1,2,3		578	<i>Spirosoma</i> sp. APU1a (AB539840.1)	99%
14/1,3		578	Uncultured bacterium (JF227818.1)	100%
14/2		565	<i>Arabidopsis thaliana</i> chloroplast DNA (AP000423.1)	99%
15/1		561	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (HF558417.1)	99%
15/2		560	Uncultured bacterium (FQ659400.1)	100%
15/3		561	Uncultured bacterium clone nbw362a08c1 (GQ076207.1)	99%
16/1		560	Uncultured <i>Methylobacterium</i> (KC011139.1)	100%
16/2		560	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NR_102897.1)	100%

4.4.3 DGGE-Vergleich der Phyllosphärengemeinschaften

Mithilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) wurden in der vorliegenden Arbeit die bakteriellen Gemeinschaften auf vier ausgewählten *cer*-Mutanten *cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16*, sowie dem zugehörigen Ler-Wildtyp nach einer Freilandwachstumsperiode untersucht. Es wurde hierfür wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben verfahren. Je Pflanzenlinie wurden 3-4 biologische Replikate untersucht. Der Versuch wurde mit Pflanzen, die im Frühjahr der Jahre 2010 und 2011 für vier Wochen Freilandbedingungen ausgesetzt waren, durchgeführt. Bereits in den ersten Untersuchungen, die mit Proben von 2010 angezogenen Pflanzen durchgeführt wurden, zeigten sich die aus den Versuchen mit der Col-0 und der *g/1*-Linie bekannten, individuellen Varianzen zwischen den einzelnen Pflanzenreplikaten (Abb. 34, weitere Gelbilder im Anhang 7.7, Abb. C). Im Vergleich zeigten sich jedoch zwischen den bakteriellen Gemeinschaftsprofilen des Wildtyps und der *cer1*-Mutante sowie zwischen dem Wildtyp und der *cer9*-Mutante Unterschiede in den Bandenmustern, die durch die softwaregestützte Bildauswertung bestätigt wurden. Im Vergleich der *cer6*- und der *cer1*-Mutante konnten keine homogenen Cluster der beiden Pflanzenlinien gebildet werden. Die bakteriellen Gemeinschaften dieser Pflanzenlinien schienen im Jahr 2010 einander ähnlich zu sein. Die *cer16*-Mutante war im Jahr 2010 noch nicht Gegenstand der Untersuchungen und auf den Gelen wurden nicht alle Pflanzenlinien mit den Wildtyp-Proben verglichen.



0,44 0,60 1,00



0,53 0,70 0,80 1,00

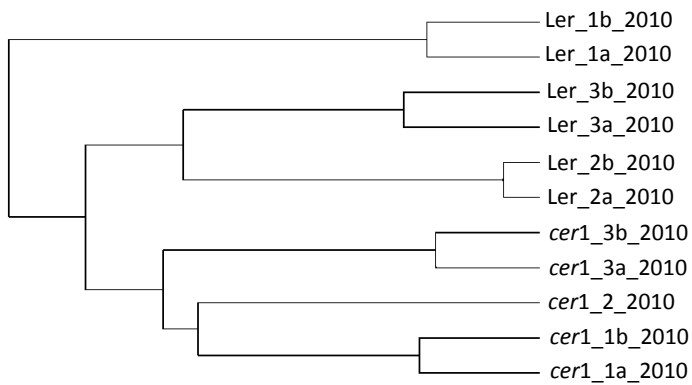


Abb. 34 – Fortsetzung nächste Seite

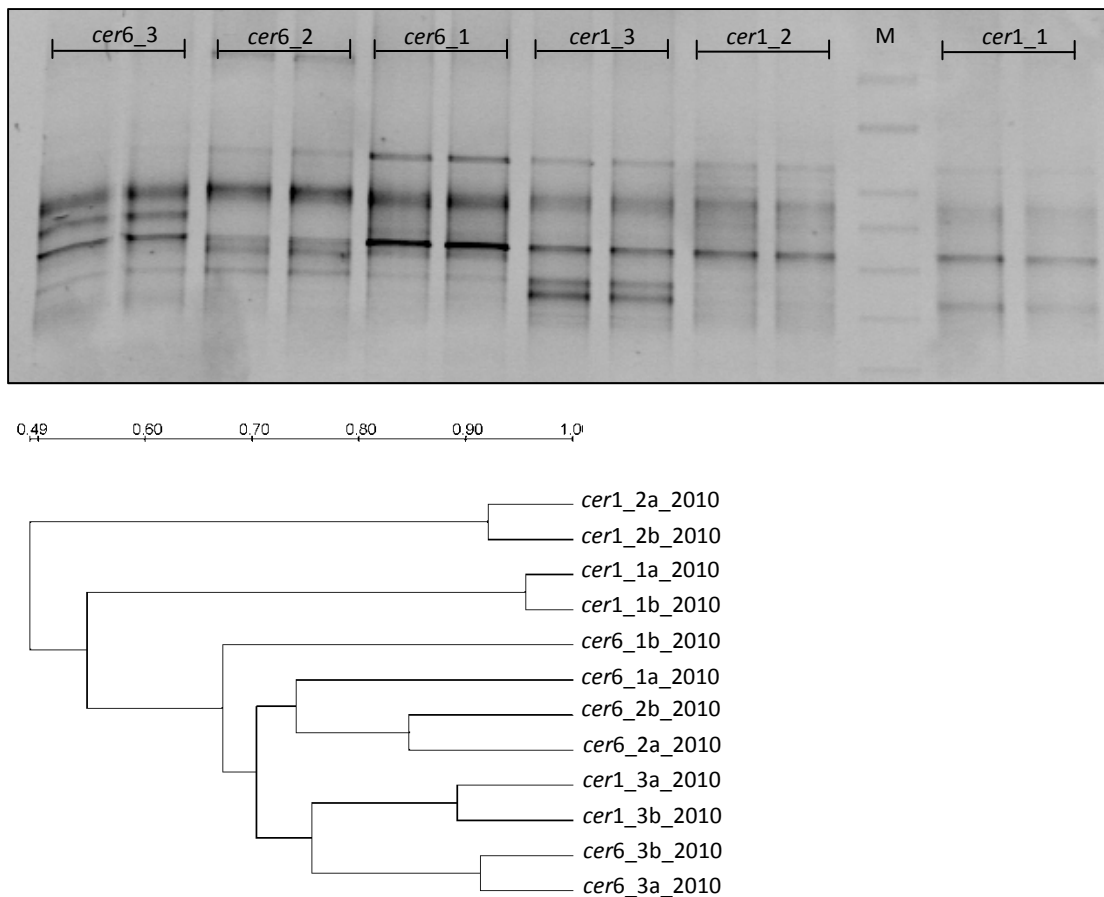
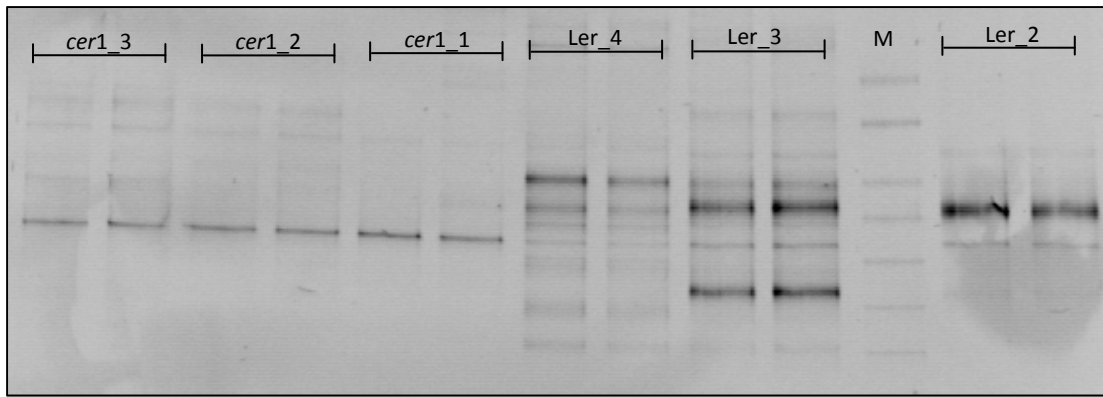
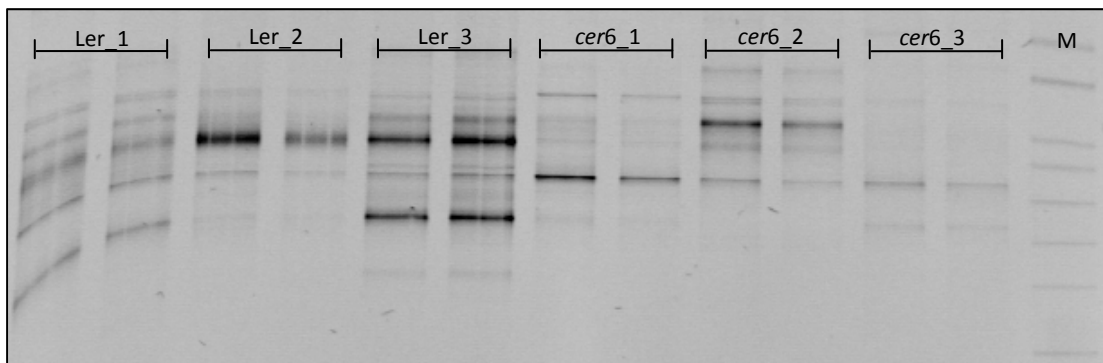
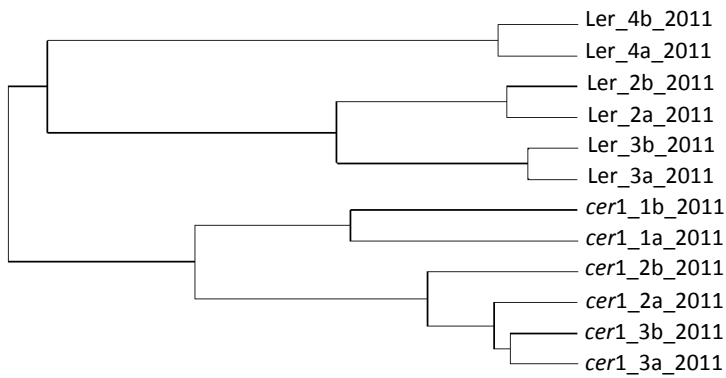


Abb. 34: DGGE-Profile von bakteriellen Gemeinschaftsprofilen von *A. thaliana* Ler und der *cer1*-, *cer6*- und *cer9*-Linien im Vergleich sowie jeweils unter jedem Gel das Ergebnis der softwaregestützten Bildauswertung. Die Bakteriengemeinschaften waren von Pflanzen isoliert worden, die 2010 eine Freilandanzuchtperiode von 4 Wochen durchlaufen hatten. Je Abwasch-Replikate wurden 2 unabhängige PCR-Ansätze als technische Replikate aufgetragen. Zudem ist ein DGGE-Marker (M) aufgetragen, dessen DNA-Fragmente bei fortschreitend höheren Gehalten der denaturierenden Substanzen denaturierten.

Während der Freilandanzuchtperiode im Jahr 2011 wurde die *cer16*-Mutante in die Untersuchungen einbezogen und die Vergleiche so durchgeführt, dass auf jedem Gel Wildtyp- und Mutantenproben miteinander verglichen wurden (Abb. 35, weitere Gelbilder im Anhang 7.7, Abb. D). Hierbei zeigte sich, dass die bakteriellen Gemeinschaften aller Mutantenlinien unterschiedlich zu den bakteriellen Gemeinschaften des Wildtyps waren. In der Clusteranalyse nach softwaregestützter Bildauswertung bildeten die Wildtypproben jeweils homogene Cluster.



0,46 0,60 0,70 0,80 0,90 1,0



0,52 0,60 0,70 0,80 1,0

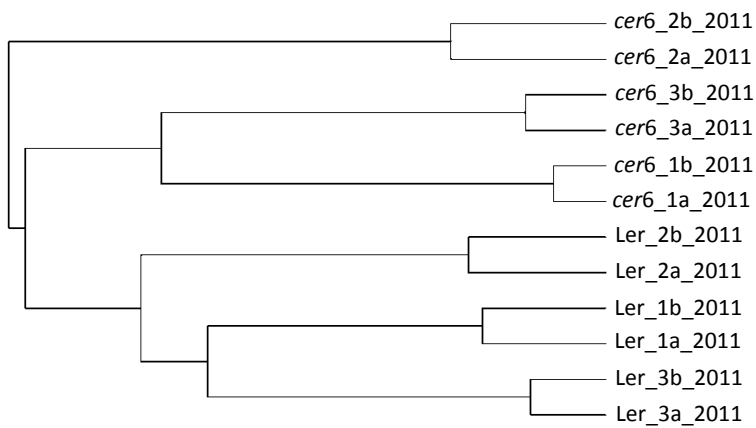


Abb. 35 – Fortsetzung nächste Seite.

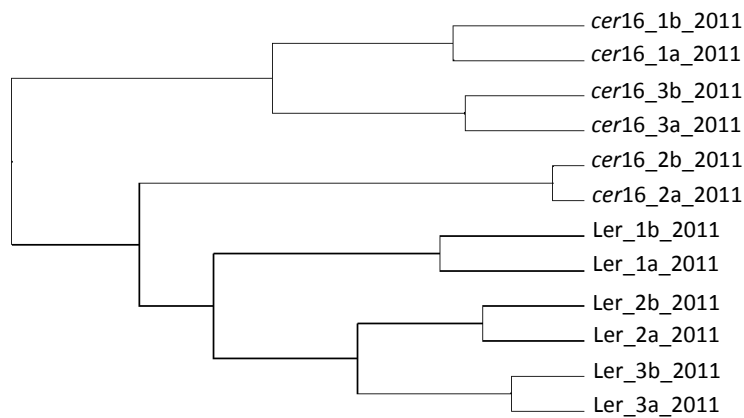
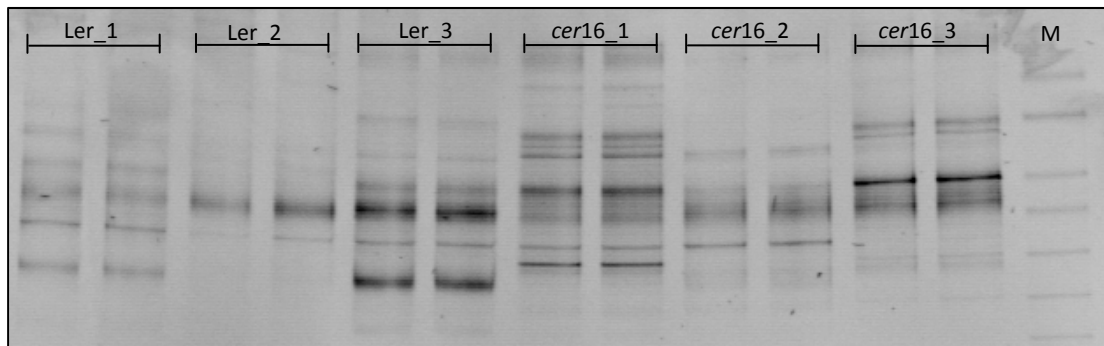
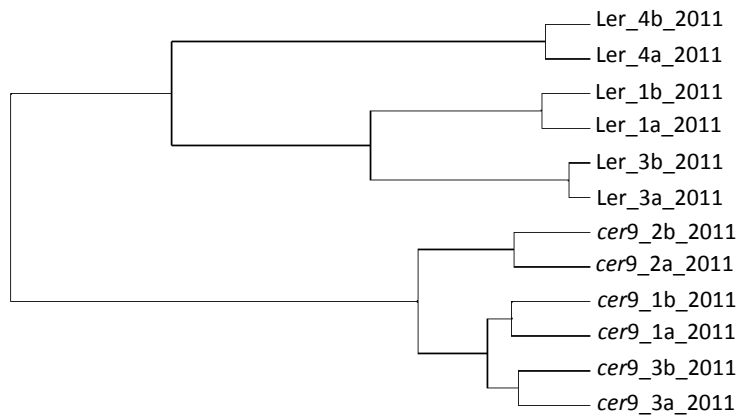
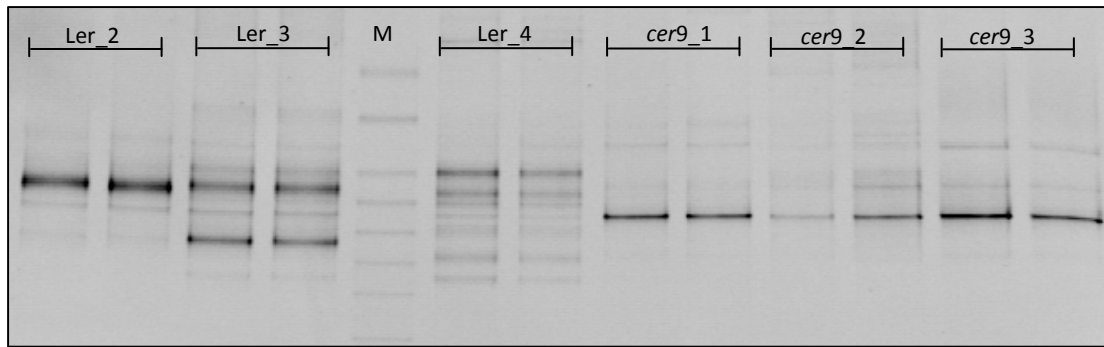


Abb. 35: DGGE-Profile von bakteriellen Gemeinschaftsprofilen von *A. thaliana* *cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16* jeweils im Vergleich zum Ler-Wildtyp. Unter jedem Gel ist das Ergebnis der softwaregestützten Bildauswertung dargestellt. Die Bakteriengemeinschaften waren von Pflanzen isoliert worden, die 2011 eine

Freilandanzuchtperiode von 4 Wochen durchlaufen hatten. Je individuellem Abwasch-Replikat wurden 2 unabhängige PCR-Ansätze als technische Replikate aufgetragen. Zudem ist ein DGGE-Marker (M) aufgetragen, dessen DNA-Fragmente bei fortschreitend höheren Gehalten der denaturierenden Substanzen denaturierten.

Die bakteriellen Gemeinschaften wurden weitergehend untereinander verglichen. Dieses geschah, indem die auf jedem Gel vorhandene Marker-Spur und die auf allen Gelen aufgetragenen Wildtyp-Proben zum Vergleich der Gele untereinander genutzt wurden. Es gingen 10 DGGE-Gele (Abb 35 und Anhang 7.7 Abb. D) in die Analyse mit ein. Banden, die auf gleicher Höhe liefen, wurden als gleicher Bandentyp definiert und es konnte eine Matrix, die alle Proben in allen technischen Replikaten und die Information über die An- und Abwesenheit aller gefundenen Bandentypen enthielt, erstellt werden. Diese Matrix wurde nun als Basis für statistische Untersuchungen verwendet. Hierbei wurde eine Nicht-metrische multidimensionale Skalierung (Non-metric Multi Dimensional Scaling, NMDS) und eine Ähnlichkeitsanalyse (ANalysis Of SIMilarity, ANOSIM) durchgeführt.

Bei der NMDS-Analyse zeigte sich, dass die bakteriellen Gemeinschaften der Pflanzenlinien *cer9* und *cer16* separat von den anderen gruppierten (Abb. 36). Dagegen schienen die Gemeinschaftsprofile des Wildtyps, der *cer1* und der *cer6*-Mutante teilweise zu überlappen und es fielen sogar Replikate des Wildtyps und der *cer6*-Linie auf gleiche Punkte im Koordinatensystem (grün-orange Punkte, Abb. 36). Die Profile der *cer9*- und der *cer16*-Mutante waren also auf rein deskriptiver Ebene unterschiedlicher zum Wildtyp und den anderen Mutanten als diese untereinander. Eine weitergehende Analyse der An-/Abwesenheitsmatrix durch eine Ähnlichkeitsanalyse (ANalysis Of SIMilarity, ANOSIM), bei der ebenfalls die Zusammensetzung der jeweiligen Proben miteinander verglichen wurde, zeigte jedoch, dass die bakteriellen Gemeinschaften der jeweiligen Pflanzenlinien signifikant unterschiedlich waren (Tab. 7). Auch der paarweise Vergleich zwischen den Pflanzenlinien zeigte signifikante Unterschiede zwischen allen Pflanzenlinien.

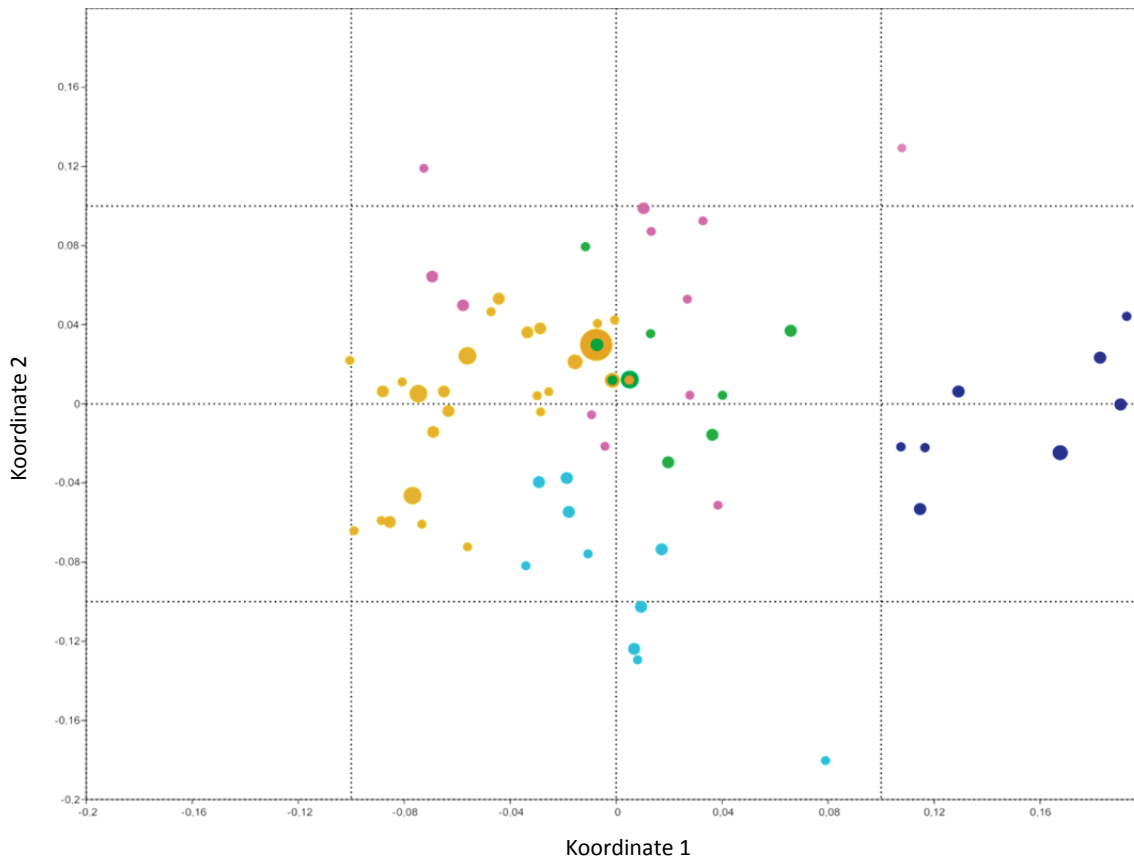


Abb. 36: Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der mittels DGGE analysierten bakteriellen Gemeinschaften von *cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16* und Ler. Die DGGE-Profile der Bakteriengemeinschaften (Abb. 35, Abb. D im Anhang) wurden in eine An-/Abwesenheitsmatrix von Bandentypen überführt und die Skalierung mit dem Jaccard-Ähnlichkeitsmaß durchgeführt. Insgesamt wurden 10 Gele in die Analyse einbezogen, die 10-18 (Wildtyp) beziehungsweise 1-5 (Mutanten) technische Replikate von je 4 biologischen Replikaten enthielten. Die Größe der Punkte entspricht der Anzahl der Replikate, die an den gleichen Punkt im Koordinatensystem fallen (kleinste Punktgröße entspricht einem Replikat). Farbcodierung: orange: Ler, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*. Stress: 0,1986

Tab. 7: Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) der in Abb. 36 beschriebenen An-/Abwesenheitsmatrix von DGGE-Profilen der untersuchten Mutanten und des Wildtyps. Es wurde das Jaccard-Ähnlichkeitsmaß verwendet. In der ersten Zeile ist die Gesamtteststatistik dargestellt und in den folgenden Zeilen sind die R-Werte der paarweisen Vergleiche der von den Pflanzenlinien isolierten Gemeinschaften gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) sind mit * gekennzeichnet ($n=15-16$ (Mutanten), $n=56$ (Wildtyp), technische und biologische Replikate inklusive).

R = 0.63		p = 0.0001			
R	Ler	<i>cer1</i>	<i>cer6</i>	<i>cer9</i>	
Ler					
<i>cer1</i>	0.4772*				
<i>cer6</i>	0.2909*	0.1935*			
<i>cer9</i>	0.9763*	0.8556*	0.9516*		
<i>cer16</i>	0.6183*	0.574*	0.7137*	0.9539*	

4.4.4 Amplicon-Pyrosequenzierung der Phyllosphärengemeinschaften

Die mittels DGGE untersuchten bakteriellen Gemeinschaften der Pflanzen aus dem Jahr wurden durch eine Ampliconsequenzierung genauer untersucht. Dafür wurden je Pflanzenlinie (Ler, cer1, cer6, cer9, cer16) drei biologische Replikate betrachtet. Es wurde, ähnlich wie für die DGGE, in jeder Probe durch universelle bakterielle Primer ein Abschnitt des 16S rRNA-Gens, idealerweise aller Bakterien in der Probe, amplifiziert. Es wurden die gleichen Primer wie für die DGGE verwendet, also die variablen Regionen V3, V4 und V5 amplifiziert. Die jeweiligen Forward-Primer wurden für jede Probe mit einem individuellen Multiplex-Identifizierer versehen, was die Zuordnung der Sequenzen zu den Proben nach gemeinsamer Sequenzierung ermöglichte.

Nach der Sequenzierung wurden die 193.289 Sequenzen zunächst nach Qualität gefiltert und in OTUs auf 97% Ähnlichkeitsebene gruppiert. OTUs sind sogenannte „Operational Taxonomic Units“ und bezeichnen Gruppen von Sequenzen, die miteinander zu 97% übereinstimmen. Es wurden 768 OTUs generiert. 3 OTUs konnten nicht an bekannte Sequenzen aligniert werden und wurden deshalb aus dem Datensatz ausgeschlossen. Eine Analyse der Sequenzen hinsichtlich potentiell enthaltener Chimären wurde mit zwei verschiedenen Referenzdatensätzen durchgeführt. Es ist bekannt, dass Sequenzen nicht nur fälschlicherweise nicht als Chimären erkannt werden, sondern auch als falsch-positive Chimären ausgeschlossen werden, weil keine Übereinstimmung mit Vergleichssequenzen im Referenzdatensatz existiert (Wright et al. 2012). Bei der Analyse des Datensatzes stellte sich heraus, dass 10 OTUs im Vergleich zu dem einen Datensatz (Greengenes core set) als Chimären erkannt wurden, im Vergleich zu dem anderen (Silva_NR) aber nicht und umgekehrt. Für eine möglichst vollständige Präsentation der Phylotypen, die in drei Replikaten der einzelnen Pflanzenlinien gefunden wurden (Abb. 40 und 41), wurden OTUs einbezogen, die nur durch einen Referenzdatensatz als Chimären detektiert wurden und durch den anderen nicht. Das sollte einen größtmöglichen Einblick gewähren, da es sich möglicherweise um falsch-positive Chimären handelte. In der betreffenden Abbildung wurden diese Sequenzen aber gesondert markiert. Für die Darstellung der für die einzelnen Pflanzenlinien als spezifisch definierten Phylotypen (Abb. 44), wurden alle potentiellen Chimären entfernt. Für alle statistischen Analysen (alle weiteren Abbildungen dieses Abschnitts) wurden die Chimären nach dem greengenes-Referenzdatensatz evaluiert und alle damit als Chimären erkannten Sequenzen entfernt. 246 OTUs des Gesamtdatensatzes entfielen auf „Singletons“, das heißt, auf OTUs die nur eine einzige Sequenz beinhalteten. Diese Einzelsequenzen sind mit einem hohen Unsicherheitsfaktor behaftet und wurden daher aus dem Datensatz entfernt. Weiterhin wurde eine OTU, der etwa 15,5% der Sequenzen zugeordnet waren, entfernt, da es sich dabei laut taxonomischer Einordnung um *A. thaliana* Chloroplastensequenzen handelte. Zurück blieben 507 OTUs in die sich 90.815 Sequenzen gruppierten. Die Sequenzen verteilten sich mit zwischen 2.343 und 10.010 Sequenzen relativ homogen auf die einzelnen Replikate.

Dieser Datensatz wurde anschließend hinsichtlich der bakteriellen Diversität untersucht. Dazu wurden „rarefaction curves“ generiert, die das Auftauchen neuer Phylotypen in Abhängigkeit von der Anzahl weiterer Sequenzen zeigen (Abb. 37). Diese Kurven wiesen für die bakteriellen Gemeinschaften aller Pflanzenlinien eine Abflachung auf, die bereits bei 250 Sequenzen begann und immer näher an eine Sättigung heranführte. Das deutet darauf hin, dass ein ausreichend großer Teil der erwarteten Diversität in den Proben mit der Sequenzierung erfasst wurde, da mit fortschreitender Sequenzanzahl immer weniger neue Phylotypen auftauchen. Dieses bestätigen auch die „Richness-estimators“ (Artenvielfalts-Schätzwerte Chao1 und ACE), die ergaben, dass etwa 85% der bakteriellen Gemeinschaften erfasst wurden (Tab. 8). Der weiterhin errechnete Pilou-Index für

die „evenness“ (Ausgewogenheit der Arten) ergab, dass es sich um unausgeglichene Bakteriengemeinschaften handelte. Das heißt, dass alle Gemeinschaften von wenigen, stark vertretenen Phylotypen beherrscht wurden und es viele, wenig stark vertretene Gemeinschaftsmitglieder gab. Die Diversitätsindices Shannon und Simpson ergaben, dass es sich um eine überdurchschnittlich diverse Gemeinschaft handelte. Im Vergleich waren sich hinsichtlich dieser Parameter alle Replikatgemeinschaften ähnlich. Die einzige Ausnahme bildete das Replikat Ler_2.

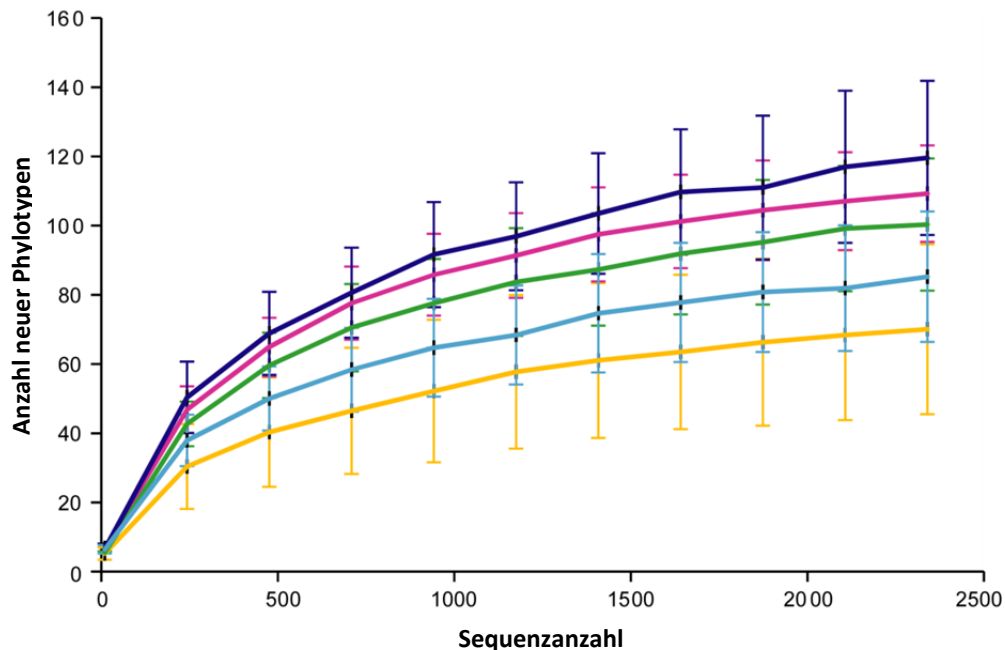


Abb. 37: „Rarefaction curves“ der Ampliconsequenzierung von je drei Replikaten bakterieller Gemeinschaften auf Blattrosetten der *A. thaliana*-Linien Ler, *cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16*. Es sind die gemittelten Kurven der drei Replikat-Proben je Pflanzenlinie gezeigt. Farbcodierung: orange: Ler, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*.

Tab. 8: „Richness-estimators“ (Artenvielfaltsschätzer), „Evenness-“ (Äquitäts-) und Diversitätsindices aller sequenzierten Replikatproben von Ler-, *cer1*-, *cer6*-, *cer9*- und *cer16*- Pflanzen.

	OTU Anzahl	Richness		Evenness	Diversität	
		Chao1	ACE	Pilou	Shannon	Simpson
Ler1	93	104 ± 7	106 ± 5	0.63	2.86	0.86
Ler2	35	38 ± 3	40 ± 3	0.27	0.94	0.39
Ler3	76	89 ± 9	91 ± 5	0.65	2.83	0.91
<i>cer1</i> _1	116	120 ± 3	122 ± 5	0.54	2.58	0.75
<i>cer1</i> _2	87	106 ± 12	105 ± 5	0.63	2.80	0.89
<i>cer1</i> _3	122	149 ± 14	145 ± 6	0.71	3.43	0.94
<i>cer6</i> _1	82	97 ± 11	95 ± 5	0.63	2.76	0.86
<i>cer6</i> _2	96	114 ± 11	113 ± 5	0.53	2.41	0.79
<i>cer6</i> _3	124	146 ± 11	148 ± 6	0.61	2.94	0.82
<i>cer9</i> _1	110	151 ± 24	131 ± 5	0.63	2.95	0.88
<i>cer9</i> _2	151	180 ± 13	189 ± 7	0.75	3.75	0.95
<i>cer9</i> _3	103	116 ± 7	123 ± 5	0.56	2.60	0.82
<i>cer16</i> _1	111	125 ± 8	130 ± 5	0.68	3.19	0.91
<i>cer16</i> _2	78	95 ± 12	94 ± 5	0.60	2.59	0.85
<i>cer16</i> _3	65	82 ± 15	78 ± 4	0.60	2.49	0.86

Die am häufigsten im Datensatz vertretenen Sequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt. Es handelte sich dabei um acht Phylotypen, die alle eine Sequenzabundanz von über 2,2% aufwiesen. Insgesamt verteilten sich 63,3% aller Sequenzen auf diese acht OTUs. Die OTUs wurden taxonomisch den Familien der Flavobacteriaceae, Flexibacteraceae, Methylobacteriaceae, Rhizobiaceae, Sphingomonadaceae, Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae zugeordnet. Alle anderen Sequenzen im Datensatz waren mit jeweils weniger als 2% Sequenzabundanz vertreten. Im Gesamtdatensatz machten die Sequenzen aller anderen OTUs 36,7% aus.

Tab. 9: Nach Sequenzabundanz am stärksten vertretene bakterielle Phylotypen bezogen auf den Gesamtdatensatz.

OTU	Sequenz- anzahl	Anteil am Datensatz [%]	phylogenetische Einordnung		
			Phylum	Klasse	Familie
301	2020	2.22	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriaceae
750	3450	3.80		Sphingobacteria	Flexibacteraceae
216	2040	2.25	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae
386	5589	6.15			Rhizobiaceae
475	9947	10.95			unbekannte Familie
546	15948	17.56			Sphingomonadaceae
54	2076	2.29		Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae
566	16383	18.04			Pseudomonadaceae
	33362	36.74			Weitere

Im Folgenden wurde der Gesamtdatensatz zumeist auf die Anzahl der Sequenzen, die das am wenigsten tief sequenzierte Replikat enthielt (2300 Sequenzen), rarifiziert (unterbeprob). Der daraus resultierende rarifizierte Gesamtdatensatz enthielt noch 463 OTUs. Diese Rarifizierung wurde für alle statistisch hinsichtlich ihrer Betadiversität untersuchten Ausschnitte des Datensatzes durchgeführt (Abb. 38, 39, 42, 43, Tab. 10, 11, 13).

Für die erste statistische Untersuchung der Unterschiede der bakteriellen Gemeinschaften zwischen den Pflanzenlinien wurde der Datensatz auf die OTUs beschränkt, die in mindestens 2 der 15 Proben nachgewiesen wurden. Dadurch wurde die Anzahl der im Datensatz enthaltenen OTUs auf 251 gesenkt, die jedoch 97% aller Sequenzen enthielten. Die Anzahl der 212 ausgeschlossenen OTUs spiegelt einerseits die geringe Ausgeglichenheit in den Gemeinschaften wieder und macht zudem deutlich, wie stark variabel die individuell beprobten Bakteriengemeinschaften waren. Für eine statistische Analyse dieses Datensatzes wurde mit relativen Abundanzen der absolut gemessenen Sequenzhäufigkeiten gerechnet. Das bedeutet, dass hierbei die prozentualen Anteile der einzelnen OTUs an der Gesamtsequenzanzahl der jeweiligen Probe als Berechnungsgrundlage dienten. In einer NMDS-Analyse (Abb. 38) zeigte sich, dass die bakteriellen Gemeinschaften insgesamt relativ unähnlich zueinander sind, jedoch die Gemeinschaften jeder Pflanzenlinie, mit Ausnahme der *cer6*-Gemeinschaften, in einen eigenen Bereich fallen, der sich nicht mit dem der anderen Pflanzenlinien zu überschneiden scheint. Eine Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) der untersuchten Gemeinschaften zueinander zeigte, dass die Gemeinschaften untereinander ungleich waren (Tab. 10). Der paarweise Vergleich der Pflanzenliniengemeinschaften untereinander machte deutlich, dass die Gemeinschaften der Pflanzenlinien *Ler-cer1*, *Ler-cer9*, *Ler-cer16* sowie *cer1-cer6* und *cer1-cer9* signifikant unterschiedlich zueinander waren ($n=3$, $p \leq 0,1$).

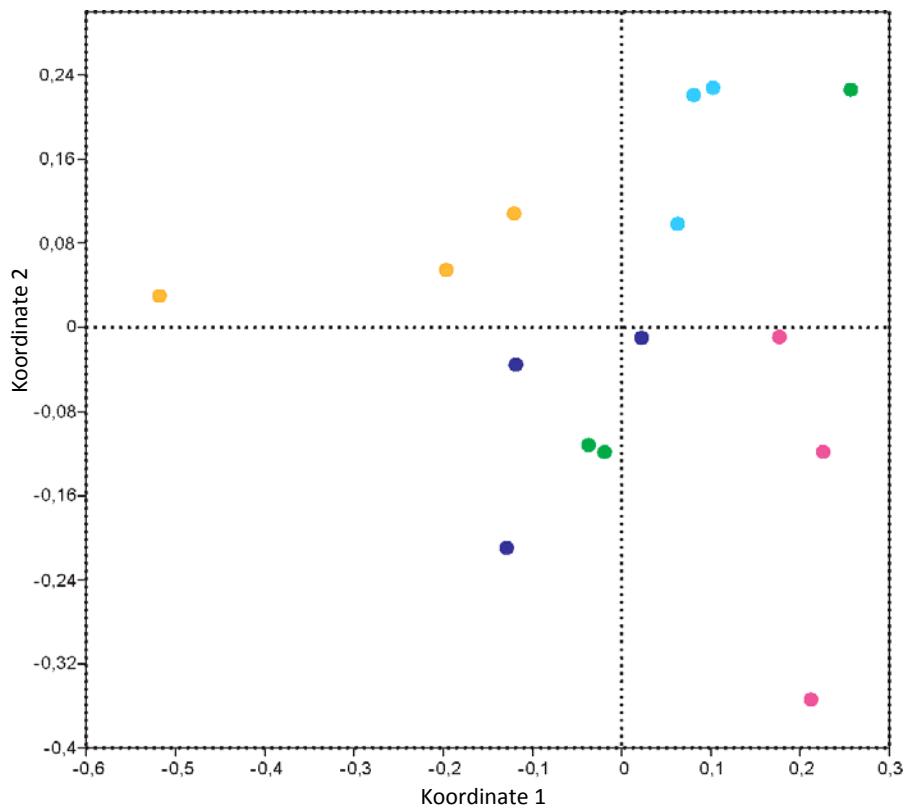


Abb. 38: Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der mittels Ampliconsequenzierung analysierten bakteriellen Gemeinschaften von *cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16* und Ler. Datengrundlage war ein rarifizierter Datensatz, der alle OTUs enthielt, die in mindestens zwei von 15 Proben auftraten. Sequenzanzahlen wurden als relative Sequenzabundanz einbezogen und das Kulczynski-Ähnlichkeitsmaß verwendet. Farbcodierung: orange: Ler, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*. Stress: 0,2779.

Tab. 10: Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) des für Abb. 38 beschriebenen Amplicon-Datensatzes. Es wurde das Kulczynski-Ähnlichkeitsmaß verwendet. In der ersten Zeile ist die Gesamtteststatistik dargestellt und in den folgenden Zeilen sind die R-Werte der paarweisen Vergleiche der von den Pflanzenlinien isolierten Gemeinschaften gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,1$) sind mit * gekennzeichnet ($n=3$). Aufgrund der geringen Replikanzahl war eine statistische Auswertung auf einem stärkeren Signifikanzniveau nicht möglich.

R = 0.6059		p = 0.0001		
R	Ler	<i>cer1</i>	<i>cer6</i>	<i>cer9</i>
Ler				
<i>cer1</i>	0.6667*			
<i>cer6</i>	0.5926	0.4444*		
<i>cer9</i>	0.5185*	0.7778*	0.2593	
<i>cer16</i>	0.7037*	0.7778	0.5926	0.963

Im Folgenden wurden die Daten pflanzenlinienorientiert weiteranalysiert. Da von jeder Pflanzenlinie drei individuelle bakterielle Gemeinschaften sequenziert worden waren, wurde das Vorkommen bakterieller OTUs in mehreren Replikaten einer Pflanzenlinie als Kriterium für die weitere Betrachtung gewertet. Dadurch wurden oft und kaum vertretene OTUs auf den einzelnen Pflanzenlinien identifiziert und die bakteriellen Gemeinschaften auf dieser Basis miteinander verglichen.

Als erste Einschränkung wurden alle OTUs ausgeschlossen, die lediglich in einem Replikat einer oder mehrerer Pflanzenlinien gefunden wurden. Als Grundlage diente hier ein rarifizierter Datensatz. Die OTUs wurden deshalb nicht weiter betrachtet, weil sie keine stichhaltige Aussage über die An-/Abwesenheit des Phylotyps auf der jeweiligen Pflanzenlinie erlaubten, da sie nur auf einem Replikat zu finden waren. Der resultierende, gekürzte Datensatz enthielt noch 175 OTUs aber 95% aller Sequenzen. Für eine statistische Analyse dieses Datensatzes wurden ebenfalls relative Abundanzen der absolut gemessenen Sequenzhäufigkeiten einbezogen. Die NMDS-Analyse zeigte, dass auch nach der Reduktion der OTUs die bakteriellen Gemeinschaften jeder Pflanzenlinie in einem eigenen Bereich clustern, der sich nicht mit dem der anderen Pflanzenlinien zu überschneiden scheint (Abb. 39). Die Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) zeigte wiederum, dass die Gemeinschaften untereinander nicht gleich waren (Tab. 11). Im paarweisen Vergleich waren die Gemeinschaften der Pflanzenlinien *Ler-cer6*, *Ler-cer9*, *Ler-cer16* sowie *cer1-cer9* und *cer9-cer16* signifikant unterschiedlich zueinander ($n=3$, $p \leq 0,1$).

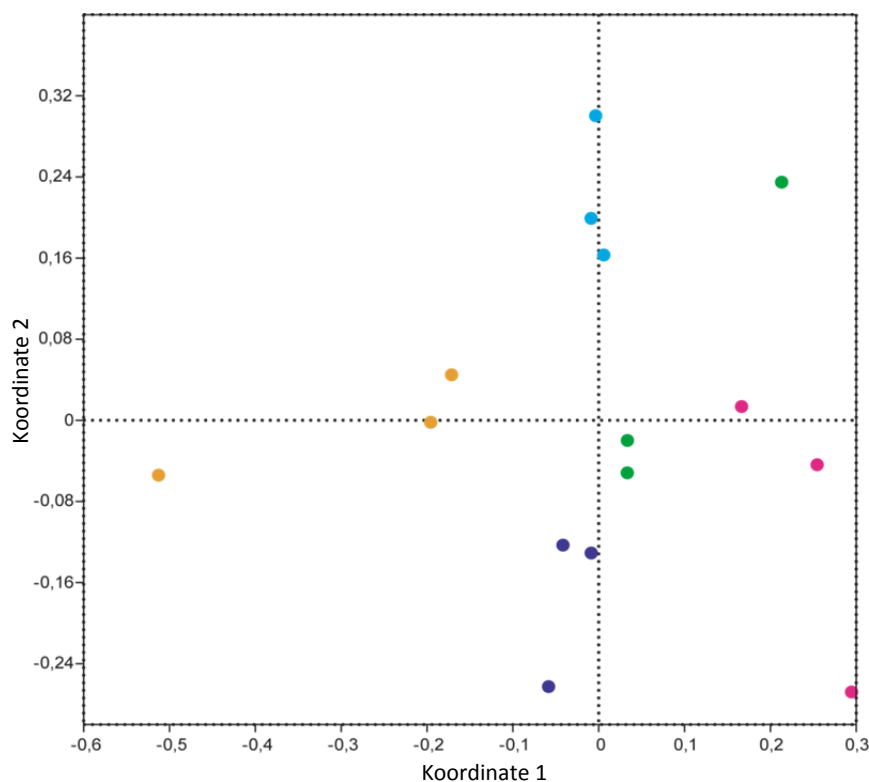


Abb. 39: Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der mittels Ampliconsequenzierung analysierten bakteriellen Gemeinschaften von *cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16* und *Ler*. Datengrundlage war ein rarifizierter Datensatz, der alle OTUs enthielt, die in mindestens zwei Replikaten mindestens einer Pflanzenlinie auftraten. Sequenzanzahlen wurden als relative Sequenzabundanzen einbezogen und das Kulczynski-Ähnlichkeitsmaß verwendet. Farbcodierung: orange: *Ler*, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*. Stress: 0,2763.

Tab. 11: Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) des für Abb. 39 beschriebenen Teildatensatzes der Ampliconsequenzierung. Es wurde das Kulczynski-Ähnlichkeitsmaß verwendet. In der ersten Zeile ist die Gesamtteststatistik dargestellt und in den folgenden Zeilen sind die R-Werte der paarweisen Vergleiche der von den Pflanzenlinien isolierten Gemeinschaften gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,1$) sind mit * gekennzeichnet ($n=3$). Aufgrund der geringen Replikanzahl war eine statistische Auswertung auf einem stärkeren Signifikanzniveau nicht möglich.

R = 0.7681		p = 0.0001			
R	Ler	cer1	cer6	cer9	
Ler					
cer1	0.8519				
cer6	0.6667*	0.8519			
cer9	0.5926*	0.9259*	0.5926		
cer16	0.7593*	0.8519	0.8148	1*	

Weiterhin wurde der Gesamtdatensatz auf solche OTUs reduziert, die sich in allen drei Replikaten mindestens einer Pflanzenlinie fanden. Dieser Teil der Gemeinschaft jeder Pflanzenlinie wurde als sogenannte „konstante“ Gemeinschaft (engl. „resident community“, Tab. 12) definiert. Dadurch wurde das strengst-mögliche Kriterium angewendet, den Datensatz auf die am sichersten auf einer Pflanzenlinie anzutreffenden Phylotypen zu reduzieren. Möglich war hierbei, dass OTUs, die zur konstanten Gemeinschaft einer Pflanzenlinie gehörten, auch auf anderen Pflanzenlinien vertreten waren, hier jedoch nicht notwendigerweise auf allen drei Replikaten. Weiterhin wurde der Datensatz nur noch auf An- und Abwesenheit der OTUs hin analysiert, um die starken Varianzen der Sequenzabundanzen, die innerhalb jeder OTU in den verschiedenen Replikaten auftraten, nicht zu gewichten. Alle OTUs, die nicht der konstanten Gemeinschaft mindestens einer Pflanzenlinie angehörten, wurden als „transiente“ Gemeinschaft definiert (Tab. 12).

Tab. 12: Definierte Anteile (Kategorien) des analysierten Amplicon- Datensatzes. Es werden die Kriterien für die Definition sowie die Anzahl der enthaltenen OTUs des Gesamtdatensatzes bzw. eines rarifizierten Datensatzes und der Prozentsatz der darin enthaltenen Sequenzen am rarifizierten Datensatz dargestellt.

Kategorie	Definitionskriterien	Anzahl der OTUs in dieser Kategorie (nicht unterbeprobt/ unterbeprobt)	Prozentualer Anteil an unterbeprobtem Datensatz
Transiente Gemeinschaft	OTUs, die nur sporadisch auftreten, d.h. in mindestens einem Replikat jeder Pflanzenlinie fehlten	431/387	15,7%
Konstante Gemeinschaft	OTUs, die in allen drei Replikaten mindestens einer Pflanzenlinie auftraten	79/76	84,3%
Kerngemeinschaft	OTUs der konstanten Gemeinschaften, die in allen Replikaten aller Pflanzenlinien auftraten oder in 14 von 15 Replikaten vorhanden waren	13/13	56,7%
Pflanzenlinien-spezifische Gemeinschaft	OTUs der konstanten Gemeinschaft einer Pflanzenlinie, die auf mindestens einer anderen Pflanzenlinie vollständig fehlten	35/23	3,5%
Spezielle, pflanzenlinien-spezifische Gemeinschaft	OTUs die nur in der konstanten Gemeinschaft EINER Pflanzenlinie auftraten	20	
	OTUs der pflanzenlinienspezifischen Gemeinschaft, die nur auf einer Pflanzenlinie vollständig fehlten	10	

Die erhaltenen Sequenzen wurden in OTUs mit 97% Sequenzähnlichkeit eingruppiert was eine Identifizierung der Phylotypen auf Gattungsebene zulässt. Für die konstanten Gemeinschaften der Pflanzenlinien ist diese taxonomische Eingruppierung in den Abbildungen 40 und 41 dargestellt. Die konstanten Gemeinschaften wurde hierfür aus einem nicht-rarifizierten Datensatz entnommen. Zudem wurden hier auch diejenigen OTUs einbezogen, die nur mit einem der beiden verwendeten Referenzdatensätze als Chimären erkannt wurden. Dadurch wurden insgesamt 79 OTUs in die Darstellungen einbezogen. Auf Phylumebene zeigte sich, dass die konstante Gemeinschaft auf allen Pflanzenlinien zu 56 bis 77% aus Proteobakterien besteht, an denen die Alphaproteobakterien den größten Anteil haben. 10 bis 28% entfallen auf Bacteroidetes-OTUs und 3 bis 10% machen Actinobakterien aus (Abb. 40). Phylotypen, die den Firmicutes und dem TM6-Phylum zugeordnet waren, fanden sich nur in den konstanten Bakteriengemeinschaften von drei Pflanzenlinien. Den Gemmatimonadetes zugehörige Phylotypen traten nur in den konstanten Gemeinschaften der Pflanzenlinien *cer6* und *cer9* auf. OTUs aus den Phyla der Acidobacteria und Deinococcus-Thermus waren nur in der konstanten Gemeinschaft der *cer9* bzw. der *cer6*-Linie vorhanden.

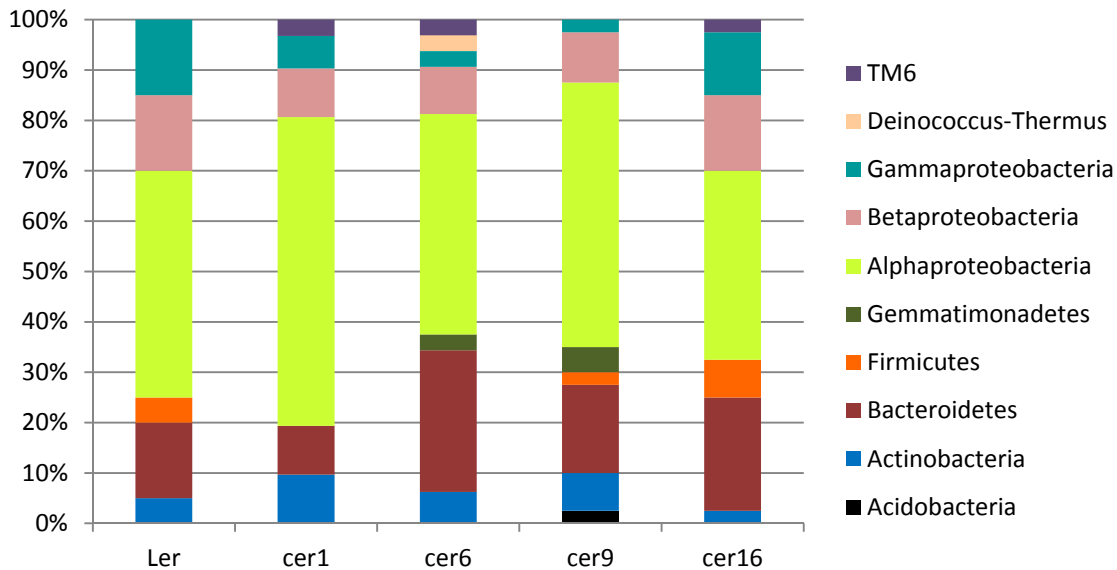


Abb. 40: Prozentuale Anteile der konstanten Bakteriengemeinschaften auf den fünf untersuchten Pflanzenlinien auf bakterieller Phylum/Subphylum-Ebene.

In Abbildung 41 wurden die zur konstanten Gemeinschaft mindestens einer Pflanzenlinie gehörenden bakteriellen Phylotypen mit ihrer An- bzw. Abwesenheit in den Einzelreplikaten dargestellt. Diese Abbildung beruht auf der gleichen Datengrundlage wie Abbildung 40 und hier wurde die Taxonomie der OTUs wo immer möglich bis auf Gattungsebene bestimmt. Es wird deutlich, dass innerhalb der konstanten Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien eine „Kern“-Gemeinschaft (engl. „core community“) besteht, die OTUs umfasst, die auf allen Pflanzenlinien zur konstanten Gemeinschaft gehören oder in 14 von 15 Replikaten aufzufinden sind (Tab. 12, Abb. 41 rot unterlegt). Zu dieser Kerngemeinschaft gehören auch die meisten der acht OTUs, die mit der größten Sequenzabundanz vertreten waren. Abgesehen davon wird erkennbar, dass es auch 35 „pflanzenlinien-spezifische“ (engl. „plant-line specific“) OTUs gefunden wurden (Tab. 12). Diese waren als Teil der konstanten Gemeinschaft auf einer oder mehreren Pflanzenlinien vertreten, während sie auf anderen Pflanzenlinien vollständig fehlten. In Abbildung 41 sind diese gelb unterlegt. Z.B. war OTU 84, die taxonomisch *Chitinophaga* zugeordnet wurde, in der konstanten Gemeinschaft der Pflanzenlinien *cer6* und *cer16* vertreten, während sie auf den Pflanzenlinien *Ler* und *cer1* vollständig fehlte. Einige der OTUs die zur konstanten Gemeinschaft auf einer Pflanzenlinie gehörten, konnten auch in Replikat-Gemeinschaften anderer Pflanzenlinien detektiert werden. Hier waren sie jedoch nicht auf drei Replikaten vorhanden und zählten per Definition nicht zu deren konstanter Gemeinschaft.

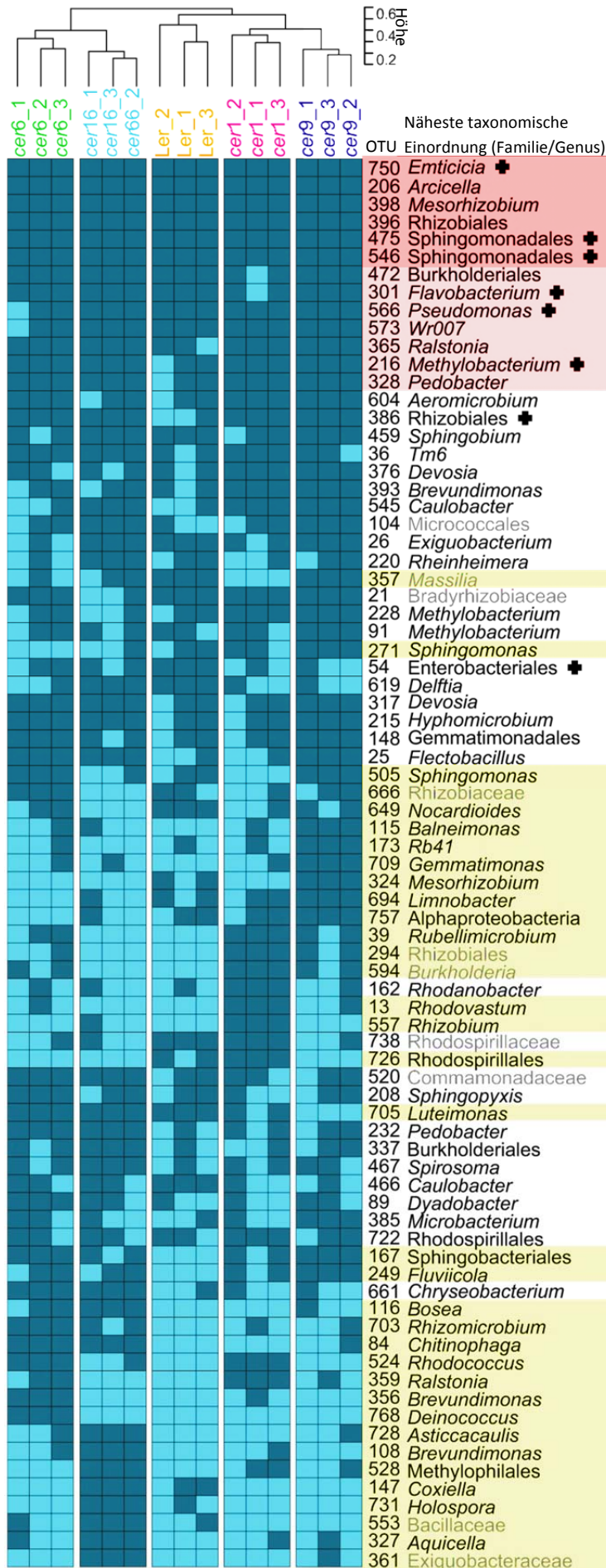


Abb. 41: An-/Abwesenheitsmatrix der OTUs der konstanten bakteriellen Gemeinschaften der untersuchten Pflanzenlinien. Hellblaue Kästchen bedeuten, dass diese OTU abwesend ist, dunkelblaue Kästchen stehen für Anwesenheit. Die taxonomische Einordnung wurde wo möglich bis auf Genus-Ebene durchgeführt. Rosé unterlegt sind die OTUs der Kern-Gemeinschaft, die in allen Gemeinschaftsreplikaten gefunden wurden. Hellrosé unterlegt sind die OTUs die in 14 von 15 Replikaten enthalten waren. Gelb unterlegt sind die OTUs der pflanzenlinien-spezifischen Gemeinschaft, die zur konstanten Gemeinschaft mindestens einer Pflanzenlinie gehören, aber auf mindestens einer anderen Linie vollständig fehlen. In einer Clusteranalyse der gezeigten Daten (am oberen Rand) gruppieren die Replikate jeder Pflanzenlinie zusammen. In grauer Schrift sind die OTUs dargestellt, die mit einem der beiden verwendeten Referenzdatensätze als Chimären deklariert worden waren.

Um diesen Teil der bakteriellen Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien statistisch auszuwerten, wurden die entsprechenden OTUs einem rarifizierten Datensatz entnommen und alle mit dem Greengenes-Datensatz erkannten Chimären ausgeschlossen. Auch hier ergab die NMDS-Analyse der Pflanzenlinien Gruppen von Replikaten der jeweiligen Pflanzenlinien, die in einem jeweils eigenen Bereich im Koordinatensystem clusterten (Abb. 42). Die ANOSIM-Analyse bestätigte für die paarweisen Vergleiche der Pflanzenlinien-assoziierten Gemeinschaften von *cer6*-Ler, *cer6-cer1*, *cer6-cer9*, *cer6-cer16* und *cer9-cer16* statistisch signifikante Unterschiede (Tab. 13, $n=3$, $p \leq 0,1$). Weiterhin wurde bei diesem Datensatz eine statistische Analyse durchgeführt, die die phylogenetische Information zu den einzelnen OTUs mit einbezieht (UniFrac). Sie sollte zeigen, ob die bakteriellen Gemeinschaften der verschiedenen Pflanzenlinien sowohl bezogen auf die An- und Abwesenheit von Mitgliedern, als auch auf die phylogenetische Herkunft der Mitglieder unterschiedlich waren. Es zeigte sich, dass die bakteriellen Gemeinschaften der *cer9*-, der *cer6*- und der *cer16*-Linie zueinander ähnlicher waren, als zu den anderen Replikaten (Abb. 43). Für die Gemeinschaften der Pflanzenlinien *cer1* und Ler war das nur für zwei der drei Replikate der Fall. Das Replikat Ler_2 clusterte mit keinem der anderen Replikate, was mit der Beobachtung der geringeren Diversität auf diesem Replikat übereinstimmt. Zur statistischen Analyse der untersuchten bakteriellen Gemeinschaften lässt sich also sagen, dass die bakteriellen Gemeinschaften der untersuchten Pflanzenlinien pflanzenlinienspezifisch verschieden sind.

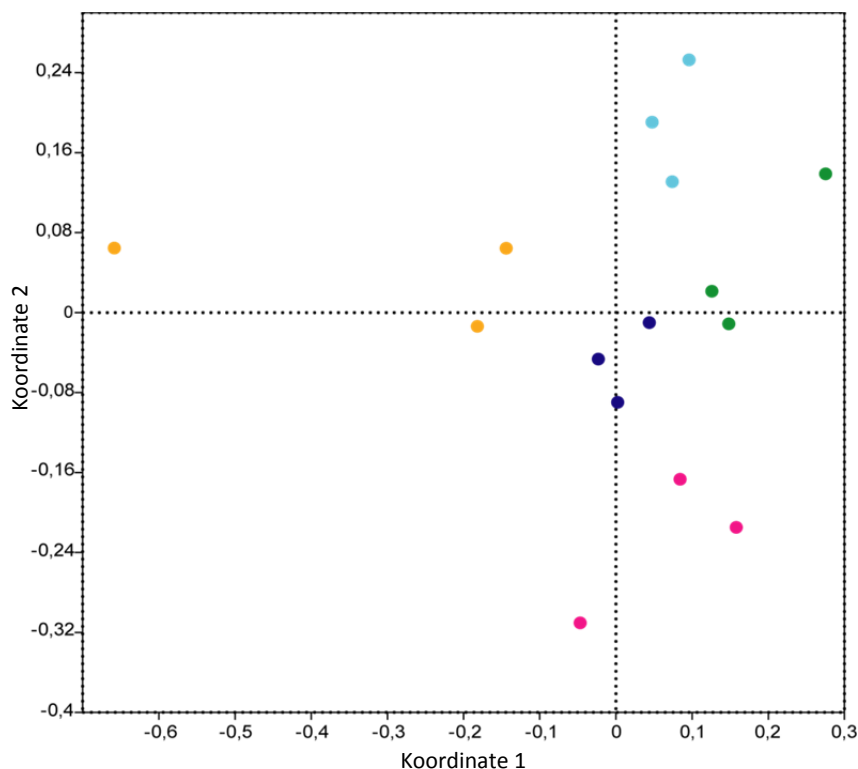


Abb. 42: Nichtmetrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der mittels Ampliconsequenzierung analysierten konstanten bakteriellen Gemeinschaften von *cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16* und Ler. Datengrundlage waren die OTUs der konstanten bakteriellen Gemeinschaften die einem rarifizierten Datensatz entnommen wurden. Es wurde das Jaccard-Ähnlichkeitsmaß verwendet und die Daten im Hinblick auf An-/Abwesenheit bakterieller Phylotypen untersucht. Farbcodierung: orange: Ler, pink: *cer1*, grün: *cer6*, dunkelblau: *cer9*, hellblau: *cer16*. Stress: 0,1997.

Tab. 13: Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) des in Abbildung 42 untersuchten Teildatensatzes der Ampliconsequenzierung, der die OTUs der konstanten bakteriellen Gemeinschaften der untersuchten Pflanzenlinien enthält. Es wurde das Jaccard-Ähnlichkeitsmaß verwendet. In der ersten Zeile ist die Gesamtteststatistik dargestellt und in den folgenden Zeilen sind die R-Werte der paarweisen Vergleiche der von den Pflanzenlinien isolierten Gemeinschaften gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,1$) sind mit * gekennzeichnet ($n=3$). Aufgrund der geringen Replikanzahl war eine statistische Auswertung auf einem stärkeren Signifikanzniveau nicht möglich.

R = 0.6615		p = 0.0001			
R	Ler	cer1	cer6	cer9	
Ler					
cer1	0.6296				
cer6	0.6667*	0.7593*			
cer9	0.5185	0.7037	0.6296*		
cer16	0.6296	0.963	0.8148*	1*	

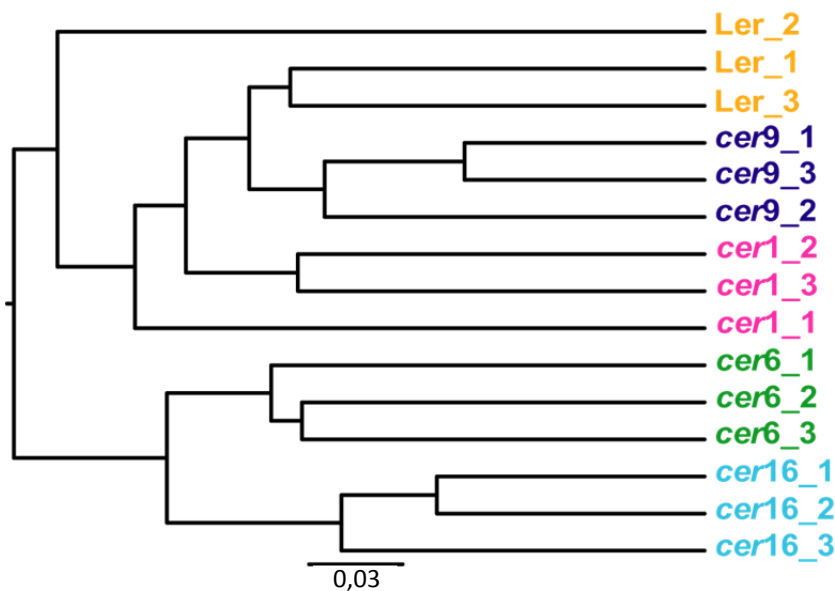


Abb. 43: UniFrac basierte Clusteranalyse der konstanten bakteriellen Gemeinschaften der fünf untersuchten Pflanzenlinien. Es wurde der in Abbildung 42 beschriebene Datensatz in Hinblick auf An- und Abwesenheit bakterieller Phylotypen untersucht.

In Abbildung 44 ist die spezielle, pflanzenlinien-spezifische bakterielle Gemeinschaft dargestellt. Diese OTUs gehörten spezifisch nur zur konstanten Gemeinschaft einer Pflanzenlinie oder fehlten spezifisch nur auf einer Pflanzenlinie (Tab. 12). Der Datensatz beruhte auf rarifizierten Daten. Es wurden zudem nur solche OTUs in die Darstellung aufgenommen, die nach wie vor die Kriterien der konstanten Gemeinschaft erfüllten und mit keinem der beiden Referenzdatensätze als Chimären erkannt wurden. Abbildungsteil B zeigt alle OTUs, die spezifisch in der konstanten Gemeinschaft einer Pflanzenlinie vorkamen und auf keiner anderen Linie Teil der konstanten Gemeinschaft waren. Abbildungsteil C zeigt die OTUs, die spezifisch auf den jeweiligen Pflanzenlinien fehlten, während sie auf allen anderen Pflanzenlinien mindestens in einem Replikat vorhanden waren. Es fällt auf, dass die Pflanzenlinien *cer1*, *cer9* und *cer16* fünf, sieben und fünf Phylotypen spezifisch aufwiesen, wohingegen auf den Pflanzenlinien *cer6* und dem Wildtyp nur zwei bzw. ein Phylotyp spezifisch vorhanden waren. Dieser Trend zeigte sich auch bei den spezifisch abwesenden Phylotypen, die auf anderen Pflanzenlinien vorhanden waren. Hier wiesen der Wildtyp und die *cer6*-Linie jeweils drei

spezifisch abwesende Phylotypen auf, wohingegen auf den Pflanzenlinien *cer1*, *cer9* und *cer16* nur ein bis zwei OTUs spezifisch fehlten. Aufgrund der Vielschichtigkeit dieser Veränderungen ist es nicht zulässig, einen direkten Zusammenhang zu Abbildungsteil A herzustellen, der die Veränderungen in der Wachszusammensetzung auf den fünf Pflanzenlinien zusammenfasst. Jedoch zeigte ein Mantel-Test, der die Matrix der Wachszusammensetzungen mit der Matrix der an-/abwesenden OTUs der konstanten bakteriellen Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien vergleicht, eine signifikante Korrelation zwischen den Unterschieden in der Wachszusammensetzung und den bakteriellen Gemeinschaften der jeweiligen Replikat-Proben ($R=0,2618$, $p=0,0054$).

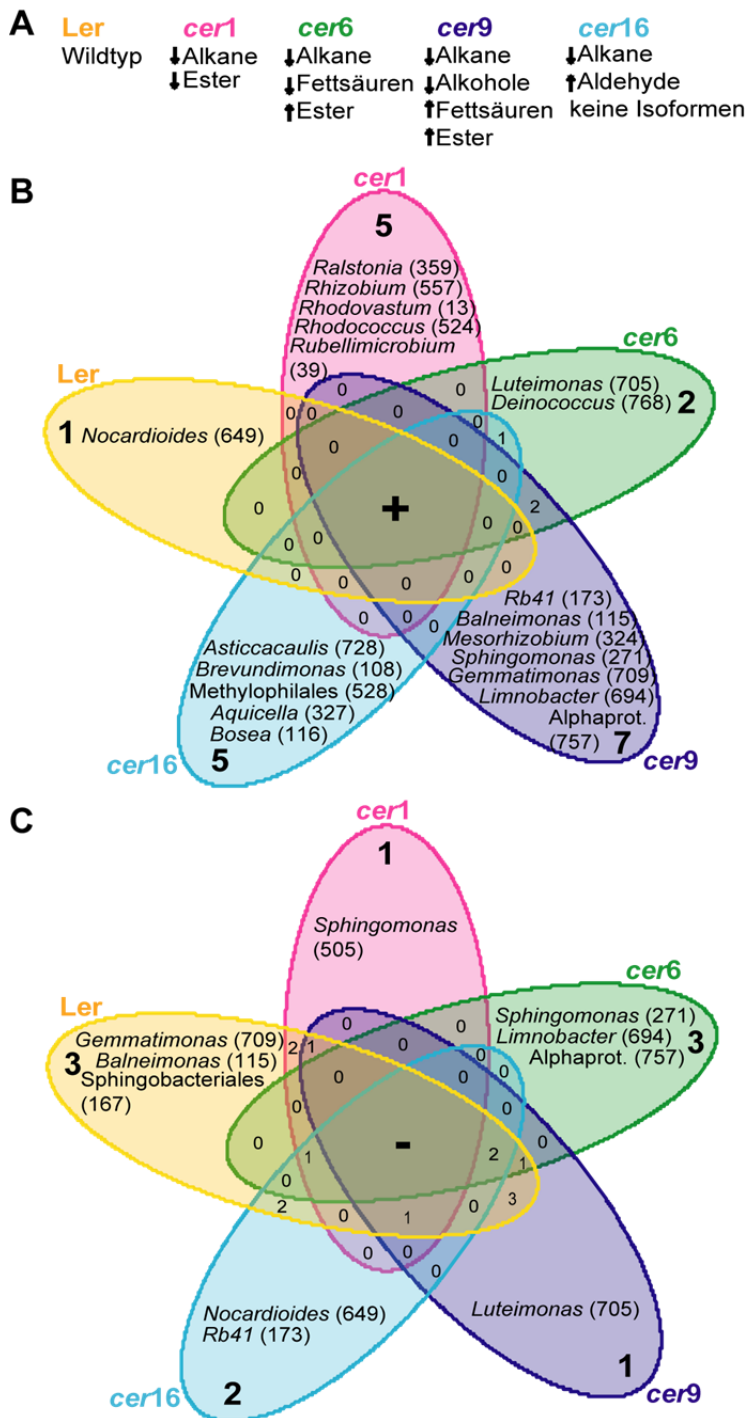


Abb. 44: Darstellung der pflanzenlinien-spezifisch an- bzw. abwesenden bakteriellen Phylotypen. Die Daten wurden aus einem rarifizierten Datensatz entnommen. Der Datensatz enthielt nur OTUs die durch keinen der beiden verwendeten Referenzdatensätze als Chimären erkannt wurden. Abbildungsteil A zeigt eine Zusammenfassung der Hauptveränderungen in den kutikulären Wachsen der Rosettenblätter der untersuchten Pflanzenlinien. Abbildungsteil B zeigt die pflanzenlinienspezifisch anwesend gefundenen bakteriellen Phylotypen, Abbildungsteil C die pflanzenlinienspezifisch abwesenden. Die jeweilige OTU-Nummer ist in Klammern angegeben.

Zusammenfassend konnte durch die Amplicon-Pyrosequenzierung die bakterielle Diversität auf den vier *A. thaliana*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp detailliert analysiert werden. Die bakteriellen Gemeinschaften waren moderat divers und bestanden aus wenigen sehr abundant sequenzierten Phylotypen und sehr vielen in geringer Sequenzabundanz vertretenen Phylotypen. Innerhalb der konstant vertretenen Gemeinschaften stellte sich eine Kerngemeinschaft von 13 Phylotypen heraus die auf allen Pflanzenlinien in (fast) allen Replikaten vertreten war. Interessanterweise traten aber 35 pflanzenlinien-spezifische Phylotypen auf, die in allen Replikaten mindestens einer Pflanzenlinie vertreten waren und auf mindestens einer anderen Pflanzenlinie vollständig fehlten. Die statistische Auswertung der Daten zeigte deutlich eine pflanzenlinien-abhängige Gruppierung der Replikate. Es schien also jede der Pflanzenlinien eine von den anderen unterscheidbare bakterielle Gemeinschaft zu besitzen.

5. Diskussion

5.1 Diversität, Stabilität und Quantität der bakteriellen Besiedelung von *A. thaliana* Blattoberflächen

Diversität

Die Blattoberfläche von *A. thaliana* ist, wie die Blattoberfläche aller natürlich wachsenden Pflanzen, von Bakterien besiedelt (Abb. 22, Abb. 23). Diese Besiedelung, die sich auch unter kontrollierten Klimabedingungen im Klimaschrank einstellt, wurde im Zuge dieser Arbeit genauer untersucht. Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit die kultivierbare, bakterielle Besiedelung von *A. thaliana* betrachtet. Von im Klimaschrank gewachsenen Col-0-Pflanzen konnten 115 kultivierbare bakterielle Isolate aus 35 verschiedenen Gattungen gewonnen werden (Abschnitt 4.2.1, Tab. 2). Von *A. thaliana* Ler-Pflanzen, die eine Freilandwachstumsperiode durchlaufen hatten, wurden 23 Morphotypen isoliert, die 11 Gattungen zugeordnet wurden (Tab. 3). Die Bakterien wurden in 7 bakterielle Phyla bzw. Subphyla eingeordnet (Abb. 19, Tab. 2 & 3). Vor allem Proteobacteria, Actinobacteria und Firmicutes bestimmten die kultivierbare bakterielle Diversität. Phylotypen dieser bakteriellen Phyla sind für ihre dominante Präsenz im Boden und auch speziell in der Phyllosphäre bekannt (Bulgarelli et al. 2013, Vorholt 2012).

Die hier gefundene bakterielle Besiedelung überschneidet sich auch auf tieferer taxonomischer Ebene mit aus anderen Studien bekannten Phylotypen. So wurden z.B. Phylotypen der Gattungen *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Bacillus* und *Plantibacter* sowohl in der vorliegenden Arbeit isoliert, als auch aus der Apfel-, Erdbeer-, Seifenkraut- oder Hornklee-Phyllosphäre (Yashiro et al. 2011, Junker et al. 2011, Krimm et al. 2005). Einige *Methylobacterium*-Spezies wurden als speziell an die Bedingungen in der Phyllosphäre angepasst beschrieben (Gourion et al. 2006, Knief et al. 2011, Corpe & Rheem 1989). Sie sind in der Lage, das von Pflanzen abgegebene Methanol als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Bestimmte Stämme anderer gefundener Gattungen, wie z.B. *Pseudomonas*, sind als Pflanzenpathogene beschrieben (Mansfield et al. 2012, O'Brien et al. 2011), obgleich die hier untersuchten Pflanzen keinerlei Krankheitssymptome aufwiesen. Von einigen *Sphingomonas*-Stämmen ist bekannt, dass sie antagonistisch zu pflanzenpathogenen *Pseudomonas syringae* wirken (Innerebner et al. 2011, Vogel et al. 2012). Auch bestimmte *Bacillus*-Arten werden zur biologischen Bekämpfung von bakteriellen oder pilzlichen Pflanzenkrankheiten eingesetzt (Choudhary & Johri 2008, Huang et al. 2012). Andere Genera, wie z.B. *Sphingopyxis* und *Novosphingobium* werden zwar wiederholt assoziiert mit Pflanzen gefunden (Vorholt 2012), können dort aber bisher keiner speziellen Funktion oder Nische innerhalb dieses Habitats zugeordnet werden.

Es wurde berichtet, dass die Pflanzenart einen bestimmenden Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft haben kann und dass auf verschiedenen Pflanzenarten bestimmte Phylotypen in unterschiedlicher Abundanz nachgewiesen werden (Kim et al. 2012, Knief et al. 2010a, Redford et al. 2010, Lambais 2006, Vorholt 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Auswahl und Isolierung kultivierbarer Bakterien versucht, möglichst viele unterschiedliche Morphotypen zu isolieren. Aufgrund dieser Vorauswahl kann hier keine objektive Aussage über Häufigkeiten im Vorkommen bestimmter Phylotypen gemacht werden. Es war jedoch auffällig, dass einige bakterielle

Gattungen wie z.B. *Pseudomonas*, *Microbacterium* und *Bacillus* in größerer Anzahl als andere isoliert wurden.

Die untersuchte bakterielle Besiedelung der Pflanzen im Klimaschrank wurde als eine minimale bakterielle Besiedelung angenommen, da hier der Eintrag von Bakterien lediglich über das Gießwasser und die Luft erfolgen konnte. Im Freiland hingegen wurde die Besiedelung aus weiteren natürlichen Quellen wie Niederschlag, Wind, Bodenpartikeln oder mit der Pflanze interagierenden Tieren erwartet. Einige der gefundenen Spezies wurden nur von Pflanzen aus dem Klimaschrank isoliert (*Shinella*, *Brevibacillus*, *Acinetobacter*), andere nur von im Freiland gewachsenen Pflanzen (*Plantibacter*, *Bosea*, *Delftia*). Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Isolierungsversuche im Freiland weniger umfangreich ausgefallen waren, als von Klimaschrankpflanzen (Abschnitt 4.2.2). Auffällig war, dass auf den untersuchten Pflanzen aus dem Freiland der Anteil der isolierten Actinobakterien höher war als auf im Klimaschrank gewachsenen. Actinobakterien, wie z.B. *Rhodococcus* sind für ihr großes Potential, verschiedene komplexe Umweltchemikalien wie polyaromatische Verbindungen oder langkettige Alkane abzubauen bekannt und sie sind häufig in der Lage, oberflächenaktive Substanzen zu bilden (Larkin et al. 2005, van Beilen & Funhoff 2007, Domingues et al. 2013 abstract). Daher könnten sie durch ihre hohe Substratvariabilität oder bessere Substratzugänglichkeit in der Lage sein, auch bei möglicherweise geringerem Nährstoffangebot einen Vorteil gegenüber anderen bakteriellen Gruppen zu haben. Jedoch entsprechen auch einige der im Klimaschrank gefundenen bakteriellen Gruppen denen, die auf im Freiland kultivierten Pflanzen gefunden wurden. Vor allem ist das der Fall für die mehrfach isolierten Gemeinschaftsmitglieder wie *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus* und *Methylobacterium*. Auch Kniskern et al. (2007) konnten verschiedene *Pseudomonas*- und *Bacillus*-Arten in großer Zahl von *A. thaliana* isolieren, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um häufige Kolonisierer von *Arabidopsis* handelt. *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* und *Bacillus*-Arten wurden auch als Endophyten aus *A. thaliana*-Samen isoliert (Truyens et al. 2013). Sie könnten daher bereits trotz Oberflächensterilisation über das Saatgut auf die Pflanze gelangt sein und somit eine stabile Grundgemeinschaft von *A. thaliana* darstellen, die möglicherweise auch unabhängig von klimatischen Bedingungen mit dieser Spezies assoziiert ist.

Stabilität

Ein weiterer Versuch zeigte, dass variable Umweltbedingungen in verschiedenen Anzuchtchargen eine teilweise unterschiedliche bakterielle Besiedelung verursachen können. So wurden, mittels kultivierungsunabhängiger DGGE-Analyse, die bakteriellen Gemeinschaften auf *A. thaliana* Ler nach vier Wochen Freilandperiode in zwei verschiedenen Jahren untersucht (Abschnitt 4.4.2., Abb. 33). Zunächst zeigte sich, dass die Anzahl der sichtbaren Banden, die einen Überblick über die Diversität der Gemeinschaften vermittelt, in beiden Jahren in etwa konstant war (2011: 6-10 Banden, 2010: 5-7 Banden). Der Vergleich der Zusammensetzung der Gemeinschaften zeigte jedoch auch deutliche Unterschiede zwischen den Jahren. So wurden unter anderem Sequenzen von *Massilia* und *Spirosoma* nur in 2010, Sequenzen von *Agrobacterium* und *Exiguobacterium* nur in 2011 nachgewiesen (Tab. 6, Abb. 33). Vermutlich ist hierbei der Einfluss klimatischer Faktoren von Bedeutung. Von Rastogi et al. (2012) wurde gezeigt, dass markantes Wetter starke Unterschiede in der bakteriellen Besiedelung hervorrufen kann. Außerdem ist bekannt, dass die Jahreszeit einen großen Einfluss auf bakterielle Gemeinschaften haben kann (Williams et al. 2013, Rastogi et al. 2012,

Redford & Fierer 2009). Zwar wurden die bakteriellen Gemeinschaften von *A. thaliana* Ler in beiden Jahren in etwa zur gleichen Zeit im Freiland kultiviert, jedoch war das Frühjahr eines Jahres deutlich kühler und regnerischer (2010, Abschnitt 3.2) als das andere. In 2011 herrschten während der Freilandperiode bereits sommerlich heiße Temperaturen bei geringen Niederschlägen. Daher könnte die bakterielle Besiedelung eines Jahres eher der des Frühjahrs entsprechen und die des anderen Jahres bereits an sommerliche Bedingungen angepasst sein. Trotzdem wurden einige bakterielle Phylotypen (z.B. *Methylobacterium* und *Azospirillum*) in beiden Jahren in der Phyllosphäre der Pflanzen gefunden, was auf einen durch Temperatur und Wetter unbeeinflussten Teil der bakteriellen Gemeinschaft hindeutet.

Quantität

Es wurde weiterhin nachvollzogen, wie sich die bakteriellen Gemeinschaften im Klimaschrank bzw. während der Freilandperiode quantitativ entwickelten (Abschnitt 4.4.1). Dabei wurde festgestellt, dass nur während der Freilandperiode eine quantitativ mit Literaturdaten vergleichbare bakterielle Besiedelung aufgebaut wurde. Aus der Literatur sind Gesamtzellzahlen von Laub- und Nadelbäumen aus Nordamerika von etwa $0,4 - 6 \times 10^5$ Zellen cm^{-2} Blattfläche bekannt (Redford et al. 2010). Auch auf *A. thaliana* wurden nach einer Freilandperiode $2,7 - 6,3 \times 10^5$ Zellen cm^{-2} nachgewiesen, nach einer Periode in einem anderen Jahr jedoch nur maximal $0,8 \times 10^5$ Zellen cm^{-2} Blattfläche (Abschnitt 4.4.1, Abb. 32, Abb. 26). Auch diese Schwankungen könnten auf klimatische Bedingungen zurückgeführt werden, da die geringeren Zahlen nach der Freilandperiode 2011, die besonders trocken und heiß war, erhoben wurden.

Die Anzahl kultivierbarer Bakterien wurde, ebenso wie die Gesamtzellzahlen, nach der Freilandperiode im Vergleich zu Klimaschrankwachstum stark erhöht gefunden ($1-5 \times 10^4$ Kolonien bildende Einheiten cm^{-2} Blattfläche) und lag damit im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Werte von 10^4-10^5 Kolonien je Gramm Frischgewicht (Yadav et al. 2004). Andere Quellen beschreiben die Anzahlen bakterieller Zellen mit 10^6-10^7 Zellen cm^{-2} Blattfläche bzw. bis zu 10^8 Zellen pro Gramm Frischgewicht (Lindow & Brandl 2003). Dabei werden Zusammenfassungskartikeln zitiert, die ebenfalls auf der Quantifizierung kultivierbarer Bakterien beruhen (Hirano & Upperr 2000, Beattie & Lindow 1995). Hierbei gilt es allerdings zu bedenken, dass die meisten damaligen Untersuchungen sich auf die Beobachtung der Entwicklung pflanzenpathogener Bakterien konzentrierten. Die erwähnten Zahlen basieren somit auf Kolonie-Zählungen nach Inokulation von Pflanzen mit pathogenen oder nicht-pathogenen Keimen (Wilson et al. 1999, Kinkel et al. 1995, Cafati & Saettler 1980, Leben 1988), was mit der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Situation nicht vergleichbar ist.

Hauptsächlich wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen klar, dass sich durch die Freilandperiode tatsächlich eine wesentlich größere Zahl an Bakterien ohne gezielte Inokulation auf den Blättern der Pflanzen ansiedelt. Der Vergleich mit den Literaturdaten zeigt, dass sich die erhobenen Daten nach der Freilandperiode nahe an der natürlichen Situation des Freilandwachstums bewegten. Daher kann angenommen werden, dass sich auf diesen Pflanzen tatsächlich eine naturnahe Besiedelung mit Bakterien einstellte.

5.2 Einfluss von Trichomen

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss der nicht-drüsigen Trichome von *A. thaliana* auf blattassoziierte bakterielle Gemeinschaften untersucht. Die Kutikula von Pappel und *Vicia faba* wurde im Bereich der Trichome dieser Pflanzen als durchlässiger für Wasser und gelöste Substanzen als die restliche Blattoberfläche beschrieben (Schlegel et al. 2005, Remus-Emsermann et al. 2011). Die Beobachtung drüsiger und nicht-drüsiger pflanzlicher Trichome als bevorzugtem Kolonisierungsort von Bakterien wäre dadurch erklärbar (Baldotto & Olivares 2008, Monier & Lindow 2004, Barak et al. 2011). Auch wurde eine positive Korrelation zwischen Trichomdichte und bakterieller Besiedlungsdichte auf mediterranen Pflanzen beobachtet (Yadav et al. 2005). Daher wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, untersucht, ob die nicht-drüsigen Trichome von *A. thaliana* die blattassoziierte bakterielle Besiedlung hinsichtlich ihrer Quantität und Diversität beeinflussen. Die verwendeten Pflanzenlinien waren *A. thaliana* Col-0, deren Blätter behaart waren und *gl1*, deren Blattspreiten keine Trichome aufwiesen (Abb. 25).

Vergleichbare kutikuläre Wachse der Col-0 und *gl1*-Linie

Um zu untersuchen, ob auf den Pflanzen mit und ohne Trichome weitere Oberflächenunterschiede bestehen, wurde eine Analyse der kutikulären Wachszusammensetzung dieser beiden Pflanzenlinien durchgeführt (Abschnitt 4.1.1). Dazu waren Pflanzen aus kontrollierten Klimabedingungen verwendet worden, da solche Pflanzen in dieser Studie auch für die Mehrheit der Untersuchungen zur bakteriellen Besiedlung eingesetzt wurden. Im Hinblick auf die Gesamtwachsmenge wurden in den kutikulären Wachsextrakten der hier analysierten Pflanzen 1,3 (Col-0) bzw. 1,0 (*gl1*) μg Gesamtwachs pro cm^2 Blattfläche gefunden. Literaturdaten weisen auf 0,7 bis 0,9 $\mu\text{g cm}^{-2}$ Gesamtwachsmenge auf Col-0/*gl1*-Blättern hin (Buschhaus & Jetter 2012, Bourdenx et al. 2011, Voisin et al. 2009, Kosma et al. 2009). Die nachgewiesenen Gesamtwachsmengen sind also mit den Literaturdaten in etwa vergleichbar.

Auch die Wachszusammensetzung beider Pflanzenlinien erscheint in der Gesamtbetrachtung vergleichbar mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen (Buschhaus & Jetter 2012, Bourdenx et al. 2011, Voisin et al. 2009, Kosma et al. 2009). Auch hier wurden in den kutikulären Wachsextrakten von *A. thaliana* Col-0- bzw. *gl1*-Blättern hauptsächlich Alkane, Fettsäuren und Alkohole gefunden. Allerdings fällt auf, dass die gefundenen absoluten und relativen Mengen sowohl zwischen den Publikationen, als auch im Vergleich zu den hier präsentierten Daten variieren. So wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt geringere Mengen Alkane und Aldehyde gefunden als im Vergleich zur Literatur (Abb. 10). Weiterhin wurden in den Arbeiten von Bourdenx et al. (2011) und Kosma et al. (2009) keine längerkettigen Fettsäuren als C_{28} und keine Sterole, aber verhältnismäßig große Mengen Aldehyde gefunden. Buschhaus & Jetter (2012) hingegen fanden, im Einklang mit den hier präsentierten Daten, in den Wachsen der *gl1*-Mutante sowohl Sterole als auch C_{32} - und C_{34} -Fettsäuren als Hauptkomponenten dieser Stoffklasse (Abb. 12). Hinsichtlich der Verhältnisse der Einzelkomponenten innerhalb der verschiedenen Stoffklassen wird übereinstimmend von C_{29} -, C_{31} - und C_{33} -Alkan als Hauptkomponenten der Alkane sowie C_{30} - und C_{32} -Alkohol bzw. verzweigter Isoalkohol als Hauptkomponenten der Alkohole berichtet (Bourdenx et al. 2011, Buschhaus & Jetter 2012, Voisin et al. 2009, Kosma et al. 2009, Abb. 12).

Gründe für die beobachteten Unterschiede könnten, neben der Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel welche nicht alle Wachskomponenten gleich gut lösen, z.B. variable Anzuchtbedingungen der Pflanzen sein. So ist bekannt, dass variable Wasserverfügbarkeit oder Lichtintensität Veränderungen in den aufgelagerten Mengen der jeweiligen Substanzen bewirken können (Bernard & Joubès 2013, Kosma et al. 2009, Shepherd & Griffiths 2006). Auch entwicklungspezifische Veränderungen von Arabidopsiswachsen sind bekannt (Jenks et al. 1996). Da in der vorliegenden Arbeit die Pflanzen im Alter von 10-12 Wochen analysiert wurden, in den meisten der genannten Publikationen hingegen im Alter von 2-6 Wochen, könnten solche Veränderungen durchaus ins Gewicht fallen.

Bezüglich der Vergleichbarkeit der untersuchten Oberflächen kann man von minimalen Unterschieden ausgehen. Bis auf eine signifikant erniedrigte Alkankomponente (C_{33} -Alkan) waren die Gehalte der kutikulären Wachsbestandteile in den Wachsextrakten der Col-0- und *g/1*-Linie nicht signifikant unterschiedlich voneinander (Abb. 10, Abb. 12). Die unterschiedlichen Mengen des C_{33} -Alkans sowie auch die nicht signifikant erniedrigten Mengen der C_{29} - und C_{31} -Alkane in den *g/1*-Extrakten könnten auf eine möglicherweise unterschiedliche Wachsbelegung der Trichome hindeuten, die diese Mengenverschiebung erklären könnte. Die elektronenmikroskopische Betrachtung ließ auf den Oberflächen beider Pflanzenlinien den gleichen glatten Wachsfilm erkennen (Abb. 17A & B). Weitere mögliche Unterschiede, wie eine erhöhte Durchlässigkeit der Kutikula, das Vorhandensein bestimmter Sekundärmetabolite auf der Oberfläche oder veränderte Immunantworten der einen oder anderen Pflanzenlinie, sind nicht bekannt. Somit bestand der Hauptunterschied der Oberflächen der beiden *A. thaliana*-Linien in deren nicht-drüsiger Behaarung.

Ähnliche bakterielle Diversität auf Blättern mit und ohne Trichome

Mittels DGGE wurden in der vorliegenden Arbeit blattassoziierte, bakterielle Gemeinschaften untersucht. Als Primer wurden die universellen Primer 341f/907r (Muyzer et al. 1998) verwendet, die ca. 560 Basenpaare des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifizierten. Diese erfassten auch Chloroplastensequenzen, die durch geringe Gewebeverletzungen während des Isolierungsprozesses in die bakteriellen Gemeinschaften gelangten. Von Chelius & Triplett (2001) sowie von Rastogi et al. (2010) wurden Primer beschrieben, die Chloroplastensequenzen ausschließen sollten. Die Primerpaare 799f/1492r und 27f-YM/783r sollten nur Sequenzen bakteriellen Ursprungs amplifizieren. In Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, dass das Primerpaar 799f/1492r nicht nur Chloroplasten sondern auch einige andere bakterielle Phylotypen nicht amplifizierte. Das Primerpaar 27f-YM/783r lieferte ebenfalls weniger diverse Bandenmuster in der DGGE. Daher wurden diese Primer für die in Arbeit durchgeführten Analysen nicht weiter in Betracht gezogen und der Anteil an Chloroplastensequenzen in den Proben der bakteriellen Gemeinschaften in Kauf genommen.

Die von *A. thaliana* Col-0 und *g/1*-Blättern isolierten Gemeinschaften wiesen in den DGGE Profilen eine insgesamt geringe Diversität auf (Abb. 27). So wurden in jeder Replikat-Gemeinschaft in der Regel nur vier bis fünf ausgeprägte Banden auf den Gelen sichtbar, die in einem relativ begrenzten Denaturierungsbereich (zwischen 40 und 60% Denaturierungseigenschaft der Gelsubstanz) auftraten. Im Vergleich dazu wiesen Substratproben aus den Töpfen im Klimaschrank gewachsener Pflanzen mehr Banden (ca. 20) auf, die sich über einen wesentlich breiteren Denaturierungsbereich im Gel

erstreckten (Abb. 29). Die geringe Diversität von bakteriellen Phyllosphärengemeinschaften im Vergleich zum umgebenden Boden wurde wiederholt beschrieben (Bulgarelli et al. 2013, Kim et al. 2012, Delmotte et al. 2009). Ob Sand, Ton oder Ackerboden aus temperaten oder tropischen Regionen – die dort ermittelte Diversität übersteigt die in der Phyllosphäre gefundene in der Regel um ein Vielfaches (Kim et al. 2012, Bulgarelli et al. 2012, Lundberg et al. 2012, Delmotte et al. 2009, Abb. 46 im Folgenden). Die Wurzeloberfläche und Rhizosphäre von Pflanzen scheint weniger divers besiedelt zu sein, als der sie umgebende Boden (Bulgarelli et al. 2012), jedoch trotzdem diverser als die bakteriellen Gemeinschaften der Phyllosphäre (Kim et al. 2012, Bodenhausen et al. 2013, Knief et al. 2012).

Natürlich stellte sich die Frage, ob die beobachtete geringe Diversität auf eine im Klimaschrank verminderte Besiedelung der Pflanzen zurückzuführen sein könnte. Schließlich wurde hier eine minimale Besiedelung erwartet, da der Eintrag von Bakterien nur über das Gießwasser und die Luft erfolgte. Daher wurden die blattassoziierten, bakteriellen Gemeinschaften auch an Pflanzen untersucht, die eine Freilandperiode durchlaufen hatten. Gesamtzellquantifizierungen der Blattabwaschsuspensionen ergaben hierbei eine deutlich erhöhte Zellzahl auf Pflanzen nach Freilandperiode im Vergleich zum Klimaschrankwachstum (Abb. 26). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Pflanzenlinien wurde allerdings hinsichtlich dieser Quantifizierung weder im Klimaschrank noch nach Freilandperiode beobachtet. Tatsächlich waren die beobachteten Zellzahlen ($0,3 - 0,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^{-2} Blattfläche) nach der Freilandperiode ähnlich hoch, wie die von einigen Bäumen an Naturstandorten berichteten (Minimum $0,4 - 0,6 \times 10^5$ Zellen cm^{-2} Blattfläche, Redford et al. 2010). Bemerkenswerterweise wurde aber hinsichtlich der Diversität der DGGE-Profile nach Freilandwachstum keine auffällige Veränderung im Vergleich zu im Klimaschrank kultivierten Pflanzen gefunden (Abb. 27, Abb. 30). Auch nach Freilandaufenthalt traten nur vier bis fünf ausgeprägte Banden in den DGGE-Profilen auf. Die Beobachtung geringer Diversität der Bandenmuster wurde allerdings in ähnlicher Weise auch von DGGE Profilen von *A. thaliana*-Pflanzen an einem Naturstandort berichtet (Delmotte et al. 2009). Sowohl die bakterielle Diversität als auch die Besiedelungsdichte scheinen also nach der Freilandperiode ähnlich der von vollständig im Freiland gewachsenen Pflanzen und somit für den Phyllosphärenlebensraum typisch zu sein. Die Diversität auf den beiden Pflanzenlinien schien hierbei von den Anzuchtbedingungen unbeeinflusst zu sein, auch wenn sie offensichtlich nach der Freilandperiode dichter besiedelt waren.

Beim Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften von *A. thaliana* Col-0 und der trichomlosen *g/1*-Mutante ergab sich weder für die Pflanzen aus dem Klimaschrank noch nach einer Freilandperiode ein auffälliger Unterschied in den DGGE-Profilen (Abb. 27, Abb. 30). Auf beiden Pflanzenlinien ließen sich die Sequenzen der prominenten Banden, außer Chloroplastensequenzen den Phylotypen Sphingomonadaceae, *Dyadobacter* und einem unkultivierten Bakterium mit der Accessionsnummer HM278326.1 zuordnen (Tab. 5). Das unkultivierte Bakterium war dabei der beste BLAST-Hit der isolierten Bandensequenz, die aber auch zu 97% ähnlich zu einer Sequenz eines kultivierten Stammes von *Methylophilus methylotrophus* (NR_041257.1) war. Sphingomonadaceae sind als blattassoziierte Bakterien von vielen Pflanzen, wie z.B. Reis, Sojabohne, Spinat, Wein, Apfel und verschiedenen Bäumen bekannt (Vorholt 2012, Lopez-Velasco et al. 2013, Leveau & Tech 2011, Yashiro et al. 2011, Redford et al. 2010). *Dyadobacter* hingegen wurde weniger häufig als Mitglied mikrobieller Phyllosphärengemeinschaften gefunden. Allerdings wurden Bakterien dieser Gattung von Mais isoliert und auch auf *A. thaliana* nachgewiesen (Chelius & Triplett 2000, Delmotte et al. 2009). Auch Vertreter der Methylophilaceae wurden als Teil von *A. thaliana*-Phyllosphärengemeinschaften

berichtet (Bodenhausen et al. 2013), jedoch selten von anderen Pflanzenspezies. Das deutet darauf hin, dass es sich bei *Dyadobacter* und *Methylophilus* um Phylotypen handeln könnte die auf *A. thaliana* präferiert vorkommen.

Hinsichtlich Gesamtzellzahl, Diversität und taxonomischer Identität konnten keine Unterschiede der blattassoziierten, bakteriellen Besiedelung unter den untersuchten Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Das widerspricht der eingangs gemachten Vermutung, die Behaarung der Pflanzen könnte zu Veränderungen der bakteriellen Gemeinschaften auf *A. thaliana* führen. Auch die oft beschriebenen Beobachtungen von Trichomen als bevorzugten Siedlungsplätzen von Bakterien (Baldotto & Olivares 2008, Monier & Lindow 2004, Barak et al. 2011) scheinen zumindest auf *A. thaliana* Col-0 keine Auswirkungen auf Quantität oder Diversität der Besiedelung im Vergleich zur *g/1*-Mutante gehabt zu haben. Es wurde von *A. thaliana* auch berichtet, dass Gene der Glucosinolat-Synthese in den Trichomen verstärkt exprimiert werden (Jakoby et al. 2008). Glucosinolate sind als antimikrobielle Wirksubstanzen bekannt. Auch das scheint aber keinen Einfluss auf die hier untersuchte bakterielle Besiedelung der Pflanzen gehabt zu haben.

Die nicht-drüsigen Haare von *A. thaliana* machen nur einen geringen Teil der Blattoberfläche aus. So besitzt Col-0 eine Behaarungsdichte von 117 Trichomen pro cm² und nur 0,041% aller Zellen der Epidermis eines Blattes sind Trichome (Hauser et al. 2001, Larkin et al. 1996). Trichome variieren zum Teil in Form und Größe (Melaragno et al. 1993). Die im Zuge dieser Arbeit beobachteten Trichome hatten etwa einen Basisdurchmesser von 50µm (Abb. 18F). Man könnte annehmen, dass sich auch auf Arabidopsisblättern Bereiche erhöhter Kutikuladurchlässigkeit am Fuß der Trichome befinden, wie sie von anderen Pflanzen bekannt sind (Schlegel et al. 2005, Remus-Emsermann et al. 2011). Auf *Vicia faba* betreffen diese Bereiche nur etwa einen zusätzlichen Basisdurchmesser rund um die Trichome (Schlegel et al. 2005). Übertrüge man diese Situation auf Arabidopsis, ergäbe sich ein Flächendurchmesser von etwa 150µm um jedes Trichom (Abb. 45). Das entspräche einer Fläche von etwa 0,018mm², was, multipliziert mit der Anzahl der Trichome pro Quadratmeter, nur einem Flächenanteil von etwa 0,0002% entspricht. Der größte Teil der Blattoberfläche von *A.thaliana* ist somit ohnehin trichomfrei. Allerdings scheinen die Trichome hier auch keine „Oase“ für Bakterien darzustellen, in der sich große Aggregate unterschiedlicher Bakterienspezies ansiedeln, da im Vergleich zur *g/1*-Mutante weder größere Mengen noch veränderte Diversität der Bakterien beobachtet wurden.

Auf anderen Pflanzenarten können Trichome in sehr viel größerer Dichte auftreten und erfüllen Aufgaben wie die Abschirmung von UV-Strahlung und die Vergrößerung der Grenzschicht, die vor übermäßigem Wasserverlust durch Windtrocknung schützt (Johnson 1975, Ehleringer 1984). Dadurch könnten auch für die Bakterien andere Klimabedingungen gegeben sein, die ihrem Wachstum förderlich sind. Auf Arabidopsis ist das jedoch aufgrund der geringen Trichomdichte unwahrscheinlich. Es wird hier eine Rolle der Trichome in der biotischen Abwehr vermutet (Jakoby et al. 2008), die sich aber offenbar nicht auf die kommensale bakterielle Besiedelung auswirkt. Da einige der in der Literatur beschriebenen Beobachtungen einer dichteren Besiedelung von Trichomen auf Inokulationsexperimenten mit pathogenen Bakterien beruhen (Monier & Lindow 2004, Barak et al. 2011), könnte hier durchaus ein mechanischer Rückhalt der Bakterien durch die Trichome eine Rolle spielen. Bei Inokulationsexperimenten werden große Mengen Bakterien oft in Dichten von 10⁸ Zellen ml⁻¹ durch Besprühen oder Eintauchen aufgebracht. Mit der hier beobachteten, natürlichen Einwanderungssituation ist das jedoch nicht vergleichbar. Bei natürlicher Kolonisierung gelangen die Bakterien vermutlich als Einzelzellen über Aerosole, Regeneintrag, den Boden oder Insekten in die

Phyllosphäre (Leveau 2006, Rastogi et al. 2013). Es wurden hierbei Depositionsraten aus der Luft von $12,8 \text{ cfu cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ berichtet (Vokou et al. 2012). Die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien hierbei genau auf einem seltenen Bereich erhöhter Nährstoffverfügbarkeit der Pflanzenoberfläche landen, ist gering (Remus-Emsermann et al. 2012). Die Trichome stellen, neben den Stomata, Blattadern und Zellgrenzen, nur einen Ort bevorzugter Anlagerung und potenziell erhöhter Nährstoffverfügbarkeit dar. Deshalb könnte es sein, dass das Vorhandensein/Nicht-Vorhandensein der Trichome von Arabidopsis bei ansonsten gleichen Bedingungen in einer natürlichen Kolonisierungssituation der Pflanzen nicht ins Gewicht fällt. Auch wäre es möglich, dass Unterschiede, die durch die zusätzlich vorhandenen Orte größerer Nährstoffverfügbarkeit zustande kommen, indem sich Bakterien dort verstärkt vermehren könnten, erst nach längeren Kolonisierungszeiträumen als dem untersuchten erkennbar wären.

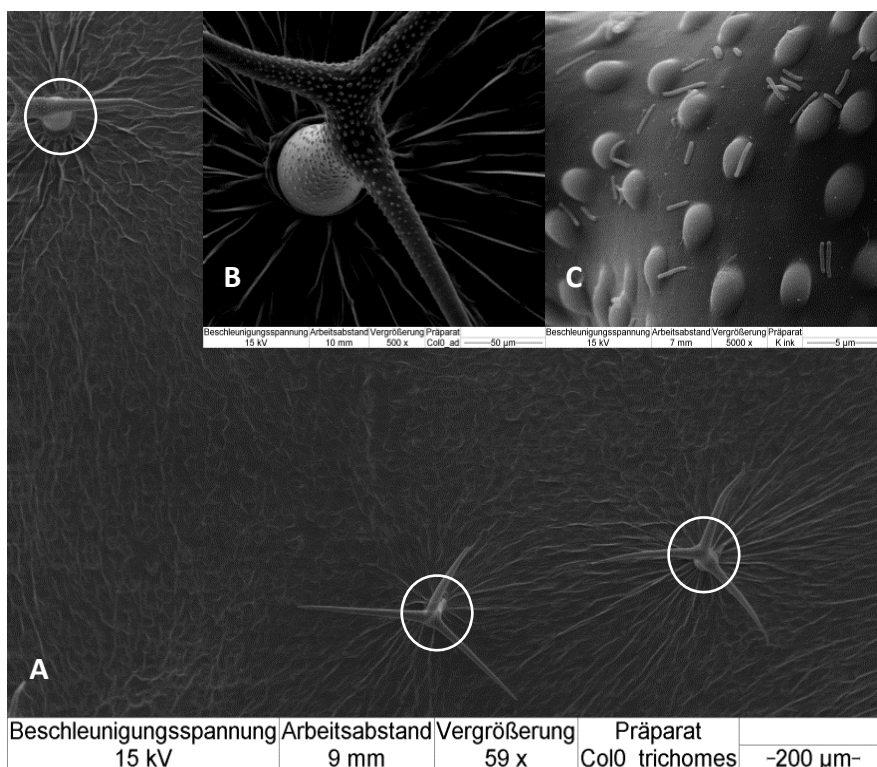


Abb. 45: Trichome auf der Col-0 Blattoberfläche und inokulierte Bakterien auf der Trichomoberfläche. Die Trichome in Abbildungsteil A umgebend ist ein Ring eingezeichnet, der den Bereich kennzeichnet, in der möglicherweise die Kutikula durchlässiger für Wasser und gelöste Substanzen sein könnte als auf dem Rest des Blatts. Das vergrößerte Trichom (B) und die Bakterien (C) sind zur Veranschaulichung der Größenverhältnisse abgebildet und machen deutlich, dass für bakterielle Dimensionen der größte Teil der Oberfläche keine Trichome aufweist.

Die Untersuchungen haben keinen Unterschied in der bakteriellen Besiedelung hinsichtlich Diversität und Quantität auf Pflanzen mit oder ohne Trichome ergeben, was aufgrund der bisherigen Beobachtungen aus der Literatur so nicht zu erwarten war. Allerdings wurde bisher noch kein direkter Vergleich bakterieller Besiedelung auf Pflanzen mit oder ohne Trichome durchgeführt, der auf natürlicher Einwanderung der Bakterien basierte und zudem Pflanzen der gleichen Art mit gleichem genetischen Hintergrund bis auf den Unterschied der Trichome verwendete. Es ist wahrscheinlich, dass der Einfluss von Trichomen auf jeder Pflanzenart anders ist und dass auch die Besiedelungshistorie eine Rolle spielt.

Im Zuge der Untersuchungen der bakteriellen Besiedelung von *A. thaliana* Col-0 und *g/1* wurde außerdem ein phylogenetischer Vergleich zwischen Phylotypen auf den beiden Pflanzenlinien wie auch zu kultivierbaren Phylotypen gezogen (Abb. 31). Dabei wurde deutlich, dass die mittels DGGE erfassten Phylotypen der beiden Pflanzenlinien einander größtenteils entsprechen. Diese Phylotypen besiedelten also sowohl die Pflanzen mit, als auch die Pflanzen ohne Trichome. Was aber auch auffiel war, dass diese Phylotypen größtenteils nicht den durch die Kultivierung gefundenen Phylotypen entsprechen. Dieses Phänomen ist bereits aus anderen Untersuchungen bekannt, die berichteten, dass sich die kultivierungsabhängig und -unabhängig erfasste bakterielle Diversität nur zum Teil entsprechen (Yang et al. 2001, Yashiro et al. 2011). Das lässt sich wohl hauptsächlich dadurch begründen, dass über kultivierungsunabhängige Techniken auch solche Bakterien erfasst werden, die unter Laborbedingungen nicht kultiviert werden können (Amann et al. 1995, Müller & Ruppel 2013). Hier könnte zum Tragen kommen, dass die DGGE die gesamte bakterielle Gemeinschaft erfasst, hiervon aber, aufgrund der visuell auflösbaren DNA-Mindestmengen, nur solche Phylotypen, die mindestens 1% der Gemeinschaft ausmachen (Muyzer & Smalla 1998). Diese scheinen im Fall von *A. thaliana* Col-0 unter den untersuchten Bedingungen nicht den wiederholt isolierten, kultivierbaren Phylotypen zu entsprechen. Somit könnte es also sein, dass die Hauptmitglieder der *A. thaliana*-Gemeinschaften auf den verwendeten Medien nicht kultivierbar sind.

Weiterhin auffällig beim Vergleich der kultivierungsabhängig und -unabhängig erfassten bakteriellen Phylotypen war die scheinbar wesentlich größere Diversität der kultivierungsabhängig erfassten Bakterien. Die im phylogenetischen Baum enthaltenen Isolatsequenzen stellten zudem nur einen Teil der insgesamt isolierten Bakterien von *A. thaliana* Col-0 dar (Tab. 2). Außerdem wurden alle eingefügten Sequenzen phylogenetisch entfernter zueinander eingeordnet als einander entsprechende Bandensequenzen. Hierbei muss beachtet werden, dass von den kultivierten Isolaten Vollängensequenzen in den Baum eingerechnet wurden, wohingegen DGGE-Sequenzen aufgrund ihrer Kürze erst im Nachhinein integriert wurden. Die längeren Sequenzen bargen somit auch mehr phylogenetische Information. Dennoch wurde die geringere bakterielle Diversität in der DGGE auch bereits in den Bandenprofilen deutlich. Die kultivierbaren Bakterien wurden von mehreren Anzuchtchargen den Pflanzen über einen längeren Zeitraum hinweg isoliert und gesammelt, während mit der DGGE jeweils die Gemeinschaften einzelner Pflanzen profiliert wurden. Das könnte zu den Diversitätsunterschieden beigetragen haben. Zudem wurden die Bakterien hinsichtlich unterschiedlicher Morphotypen isoliert, unabhängig davon, wie häufig sie sich auf den Platten befanden. Es ist also wahrscheinlich, dass hierbei ein größerer Teil der sogenannten „rare biosphere“ (die nur in geringen Häufigkeiten vorhandenen Mitglieder einer mikrobiellen Gemeinschaft) erfasst wurde, der aufgrund der Mengenlimitation in der DGGE nicht als Bande auflösbar war. Diesbezüglich ließ die Einführung neuer Sequenzieretechniken wie die Amplicon-Pyrosequenzierung im Vergleich zu herkömmlichen kultivierungsunabhängigen Methoden erkennen, dass diese die tatsächliche mikrobielle Diversität bei weitem unterschätzen (Pedrós-Alió 2012).

5.3 Einfluss der kutikulären Wachse

Eine 2002 von Marcell & Beattie veröffentlichte Studie zeigte, dass strukturelle Veränderungen der epikutikulären Wachse von Mais Einfluss auf das Anheftungs- und Ausbreitungsvermögen von inokulierten Bakterien haben können. Dabei zeigte sich, dass *Pantoea agglomerans* auf einer Maismutante, die weniger epikutikuläre Wachskristalle auf der Oberfläche besaß, größere Populationsdichten erreichte als auf Wildtyppflanzen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob sich diese Ergebnisse auch auf die natürlich einwandernde bakterielle Besiedelung von Pflanzen übertragen lassen. Von der superhydrophoben Wachsauflage von Lotus wird ein selbstreinigender Effekt der Blätter berichtet, der sich auch auf die Abwehr einwandernder Bakterien ausdehnen soll (Barthlott & Neinhuis 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass Baumblätter mit größerer Benetzbarkeit über die Zeit mehr kontaminierende Partikel akkumulierten (Neinhuis & Barthlott 1998). Was diese Untersuchungen jedoch nicht erklärten war, ob es sich bei den Beobachtungen der Partikel tatsächlich um Bakterien handelte und wodurch die Effekte ausgelöst wurden. Auch blieb unbeantwortet, ob bei den beobachteten Effekten nur die Struktur der epikutikulären Wachskristalle ausschlaggebend war, oder auch die Zusammensetzung der Wachskomponenten eine Rolle spielte.

Es stellte sich also im Rahmen meiner Promotionsarbeit die Frage, inwieweit die Zusammensetzung der kutikulären Wachse einer Pflanze deren bakterielle Besiedelung beeinflussen könnte. Dabei sollte der Fokus auf die natürliche bakterielle Besiedelung der Pflanzen gelegt werden. Die für die Untersuchung gewählten Pflanzenlinien von *A. thaliana* (*cer1*, *cer6*, *cer9* und *cer16*) wiesen im Vergleich zum Ler-Wildtyp eine stark veränderte Zusammensetzung ihrer kutikulären Blattwachse auf (Jenks et al. 1995). Durch die Verwendung dieser Mutantenlinien, die nachweisliche Defekte in ihrer Wachsbiosynthese aufwiesen, mussten auch hier keine weiteren Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden. Dabei muss bedacht werden, dass auch allein die Veränderung der Wachse bzw. der Wachsbiosynthese eine Vielzahl von Veränderungen – z.B. veränderte Durchlässigkeit der Kutikula, veränderte Wasserbenetzbarkeit, chemisch veränderte Umgebung, etc. - auf der pflanzlichen Oberfläche bewirken können (Lü et al. 2012, Vogg et al. 2004, Holloway 1970, Jetter et al. 2006).

Bestätigung der veränderten Wachszusammensetzung der cer-Mutanten

Bekannt ist, dass variable Umweltbedingungen die Zusammensetzung bzw. die Mengenverhältnisse von einzelnen Wachskomponenten verändern können (Bernard & Joubès 2013, Shepherd & Griffiths 2006) und auch Veränderungen im Zuge der pflanzlichen Entwicklung wurden bereits beschrieben (Jenks et al. 1996, Hauke & Schreiber 1998). In einer Studie von Jenks et al. (1995) waren die kutikulären Wachse der für die Analyse der bakteriellen Besiedelung ausgewählten Mutanten an Pflanzen im Alter von 2-4 Wochen analysiert worden. In der vorliegenden Arbeit aber wurden die ausgewählten *A. thaliana* *cer*-Mutanten im Alter von etwa 13 Wochen inklusive einer vierwöchigen Freilandanzuchtperiode verwendet. Ziel war es daher, den Wachsphänotyp der Mutanten unter den ausgewählten experimentellen Bedingungen zu bestätigen.

Im Großen und Ganzen konnten die mutationsbedingten Unterschiede der ausgewählten *cer*-Mutanten im Vergleich zur Literatur bestätigt werden. Das galt vor allem für die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten zueinander, nicht jedoch für die absoluten Mengen. So wurde auf allen untersuchten *cer*-Linien eine geringere Gesamtwachsaufgabe als auf dem Wildtyp nachgewiesen (Tab.

1), (Jenks et al. 1995). Nach 13 Wochen Wachstum inklusive Freilandperiode wurden in der vorliegenden Arbeit vom Ler-Wildtyp etwa $4,5\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche Gesamtwachs extrahiert (Tab. 1). Im Vergleich wurde in der Literatur auf 4 Wochen alten Ler-Pflanzen nur etwa $1\mu\text{g cm}^{-2}$ Blattfläche nachgewiesen (Jenks et al. 1995). Das entspricht einer etwa 4-5fach erhöhten Wachsmenge auf den in der vorliegenden Arbeit analysierten Pflanzen. Allerdings wurden hinsichtlich der Gesamtwachsmengen der Pflanzenlinien im Vergleich in etwa ähnliche Verhältnisse beobachtet. So war auf der *cer1*- und der *cer6*-Mutante eine etwa halb so große Wachsmenge wie auf dem Wildtyp vorhanden, auf der *cer9*-Mutante gut zwei Drittel der Wildtypmenge. Lediglich die *cer16*-Linie wurde hier ebenfalls mit gut zwei Dritteln der Wildtypwachsmenge analysiert, während in den Literaturdaten auf dieser Linie auch nur etwa die Hälfte der Wildtypwachsmenge vorhanden war (Jenks et al. 1995).

Hinsichtlich der beschriebenen, charakteristischen Veränderungen der Wachszusammensetzung der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stimmten die im Zuge dieser Arbeit gemachten Analysen wiederum verhältnismäßig für *cer1*, *cer6* und *cer9* überein. Alle untersuchten Mutantenwächse wiesen, auch nach der längeren Anzuchtperiode, eine stark veränderte Wachszusammensetzung im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 13, 14, 15). Ähnlich wie bei Jenks et al. (1995) wurden auf *cer1* und *cer9* wesentlich reduzierte Alkanmengen nachgewiesen, auf *cer6* etwa die Hälfte der in den Wildtypextrakten vorhandenen Alkanmenge (Abb. 13). Auch hier waren allerdings die absoluten Mengen auf den 13 Wochen alten Pflanzen wesentlich größer als die in der Literatur berichteten. Übereinstimmend mit der Literatur wurden in allen Extrakten nur geringe Mengen Aldehyde gefunden. Alkohole waren in den hier durchgeführten Analysen allerdings auf allen Pflanzenlinien (ausgenommen *cer9*) in etwa ähnlichen Mengen vorhanden während Jenks et al. (1995) von Mengenunterschieden zwischen den Pflanzenlinien berichtet. Abweichend von der Literatur wurden in den Blattwachsextrakten aller Pflanzenlinien zudem beträchtliche Mengen langkettiger Ester gefunden (Abb. 13, 15). Weiterhin konnten, anders als bereits beschrieben (Jenks et al. 1995), keine eindeutigen Triterpenoide in den untersuchten Wachsextrakten identifiziert werden.

Hinsichtlich der Kettenlängenverteilung der einzelnen Stoffklassen stimmten in den meisten Fällen, und sofern die jeweiligen Komponenten in den Wachsextrakten von Jenks et al. (1995) gefunden wurden, die Mengenverhältnisse überein (Abb. 14, 15). So waren bei den Alkanen C_{31} -Alkan gefolgt von C_{29} -Alkan und C_{33} -Alkan jeweils die Hauptkomponenten. Bei den Alkoholen war in der Regel C_{28} -Alkohol die Hauptkomponente. Jedoch wurden von Jenks et al. (1995) keine Isoalkohole beschrieben. Bei den Fettsäuren war die mutationsbedingte Veränderung in der *cer9*-Mutante, wie in der Literatur beschrieben, deutlich zu erkennen (Jenks et al. 1995, Lü et al. 2012). Hier wurde die C_{24} - und C_{26} -Fettsäure in stark erhöhten Mengen nachgewiesen, während längerkettige Fettsäuren nur noch in geringen Mengen auftraten (Abb. 14). Es werden allerdings weder bei Jenks et al. (1995) noch bei Lü et al. (2012) Fettsäuren mit Kettenlängen über C_{30} erwähnt, während in der vorliegenden Arbeit die Hauptkomponenten dieser Stoffklasse in den Wildtypwachsen sowie auf *cer1* und *cer16* die C_{32} - und C_{34} -Fettsäure waren (Abb. 14). Ebenso ist das Vorhandensein von Sterolen in den kutikulären Wachsextrakten von *A. thaliana* zwar bekannt (Buschhaus & Jetter 2012), wird aber in den Publikationen von Jenks et al. (1995) und Lü et al. (2012) nicht erwähnt. Diese Unterschiede können möglicherweise auch auf die Wahl des Extraktionsmittels zurückzuführen sein, das im Fall von Jenks et al. (1995) und Lü et al. (2012) Hexan war, in der vorliegenden Arbeit, sowie bei Buschhaus & Jetter

(2012) jedoch Chloroform. Die Löslichkeit mancher Wachskomponenten ist in diesen beiden Lösungsmitteln unterschiedlich.

Die Wachszusammensetzung der *cer16*-Linie erschien in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen abweichend von den Literaturdaten. Wurden von Jenks et al. (1995) wesentlich reduzierte absolute Alkan- und Fettsäuremengen sowie erhöhte Alkohol- und Estermengen von den Blattwachsen berichtet, so wurden in der vorliegenden Arbeit Alkan- und Fettsäuremengen gefunden, die im Vergleich zum Wildtyp nur gering reduziert waren (Abb. 13). Alkohole wurden auf dieser Pflanzenlinie in etwa ähnlichen Mengen wie auf dem Wildtyp gefunden und Ester wurden erniedrigt im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Auch war bisher nicht vom Fehlen der Isoformen von Alkoholen, Fettsäuren und Estern berichtet worden. Lediglich die erhöhten Aldehydmengen im Vergleich mit den anderen Pflanzenlinien stimmten mit der Literatur überein.

Gründe für die im Vergleich zur Literatur beobachteten Unterschiede in den Wachsprofilen könnten vor allem die veränderten Anzuchtbedingungen sein. So können Freilandbedingungen im Vergleich zur Anzucht im Gewächshaus zu quantitativen Veränderungen einzelner Komponenten bei *Brassica oleracea* und *Brassica napus* führen (Shepherd et al. 1995, Shepherd et al. 1997). Es ist bekannt, dass z.B. Wasserdefizit und erhöhte UV-Strahlung die Produktion verstärkter Wachsauflagen zur Folge haben können (Kosma et al. 2009, Steinmüller & Tevini 1985, Baker 1974). Auch eine signifikante Erhöhung der Mengen einzelner Wachskomponenten wurde für *A. thaliana* nach einer Periode mit Wasserdefizit beschrieben (Kosma et al. 2009), was z.B. die größeren Mengen an Estern erklären könnte, die sich in den hier durchgeführten Untersuchungen zeigen. Zudem kann die verlängerte Wachstumsperiode Auswirkungen auf die Wachszusammensetzung gehabt haben. So wurde von Jenks et al. (1996) gezeigt, dass die Mengen der Wachskomponenten einzelner Stoffklassen auf *A. thaliana* im Vergleich von 7-, 15-, 25- und 40-Tagen alten Pflanzen unterschiedlich sind. Auch Lü et al. (2012) berichten für die Wachse von Ler und *cer9* nach 6 Wochen zum Teil unterschiedliche Werte im Vergleich zu Jenks et al. (1995). So wird hier, im Gegensatz zu Jenks et al. (1995), von Gesamtwachsmengen der *cer9*-Mutante berichtet, die die Wildtyp-level überstiegen und auch die C₂₈-Fettsäure wird als Bestandteil des Mutantenwachses angegeben (Lü et al. 2012). Auch diese, möglicherweise entwicklungspezifischen, Veränderungen könnten Gründe für die nachgewiesenen Unterschiede zwischen den Literaturdaten und den hier erhobenen Daten darstellen. Die in dieser Arbeit vorläufig identifizierten Monoacylglycerole als Bestandteile der kutikulären Wachse von *cer9* wurden in der Literatur bislang nicht als Komponenten von Arabidopsis-Wachsen berichtet. Diese waren bisher lediglich als Bestandteil der Wurzeloberfläche von *A. thaliana* als C₂₂- und C₂₄-Monoacylglycerole bekannt sowie in kürzerkettigen Formen (C₁₆, C₁₈) in den kutikulären Blattwachsen von *Tipuana tipu* und *Cleistes*-Arten identifiziert worden (Li et al. 2007, dos Santos Pereira & de Aquino Neto 2003, Pansarin et al. 2008).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen bestätigten das Fortbestehen des bekannten Wachsphänotyps über eine längere Anzuchtdauer inklusive Freilandwachstumsperiode. Unterschiede zu den Literaturdaten sind vermutlich hauptsächlich auf die Umwelteinflüsse und die verlängerte Wachstumsperiode sowie zum Teil auf ein unterschiedliches Extraktionsmittel zurückzuführen. Insgesamt wurden auf den vier analysierten *cer*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark unterschiedliche Wachszusammensetzungen festgestellt, die somit jeweils eine individuelle, differenzierte Oberfläche für die Besiedelung mit Bakterien darstellen. Trotz dieser Unterschiede wurden bei einer morphologischen Analyse der Blattoberfläche von im Klimaschrank kultivierten Pflanzen unter dem Rasterelektronenmikroskop keine pflanzenlinienspezifischen, strukturellen

Veränderungen der Wachsaufgabe festgestellt (Abb. 17, C-G, Abb. 18 A-E). Die Mutationen bewirken also, soweit bekannt, Veränderungen der Kutikula und der Wachszusammensetzung sowie möglicherweise daraus resultierende Oberflächenveränderungen, jedoch keine auffälligen Strukturänderungen wie die Ausbildung von Wachskristallen. Als Mutationen eines Arabidopsis-Ökotyps hatten die ausgewählten Pflanzenlinien den gleichen genetischen Hintergrund und somit auch, abgesehen von den Veränderungen der Kutikula, die gleichen Eigenschaften.

Individuelle bakterielle Gemeinschaften auf Ler-Wildtyp und cer-Mutanten

Die bakteriellen Gemeinschaften der ausgewählten Pflanzenlinien, die sich im Laufe von 13 Wochen inklusive Freilandperiode durch natürliche Einwanderung auf den Blättern der Pflanzen eingefunden hatte, wurden hinsichtlich ihrer Quantität und Diversität untersucht. In zwei aufeinanderfolgenden Jahren wurden keine quantitativen pflanzenlinienspezifischen Unterschiede beobachtet (Abschnitt 4.4.1). Sowohl die Anzahl der kultivierbaren Bakterien als auch der mit DAPI gefärbten Zellen variierten stark zwischen den einzelnen biologischen Replikaten (also einzelnen Pflanzen). Auf keiner Pflanzenlinie wurde aber eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant veränderte Gesamtzellzahl nachgewiesen. Keine der untersuchten Pflanzenlinien schien also eine Oberfläche zu besitzen, deren Eigenschaften in besonderer Weise bakterienreduzierend oder -fördernd wirkte.

DGGE-Analysen

Mithilfe der DGGE wurden erste Diversitätsprofile der bakteriellen Gemeinschaften erstellt. Für jedes Replikat wurden die Blätter eines Pflanzenindividuums beprobt, was zwar die größtmögliche Variabilität zwischen den Replikaten bewirkte, aber auch kein fälschliches Angleichen der Gemeinschaften einer Pflanzenlinie durch die Verwendung von Pools zur Folge hatte (Prosser 2010). Die Analysen wurden mit Proben bakterieller Gemeinschaften durchgeführt, die in zwei aufeinanderfolgenden Jahren (2010 und 2011) gesammelt worden waren. Es zeigte sich bereits in den DGGE-Profilen, dass die Variationsbreite zwischen den Replikaten einer Pflanzenlinie vergleichsweise hoch war (Abb. 34, Abb. 35). Außerdem wurde deutlich, dass die Hauptvertreter der bakteriellen Gemeinschaften nur wenig divers waren, was zuvor beschriebenen DGGE-Analysen der Phyllosphärengemeinschaften am Naturstandort gewachsener *A. thaliana* und anderen Pflanzen entsprach (Delmotte et al. 2009). Dennoch wurden in den Proben beider Jahre in denen die Versuche durchgeführt wurden, deutliche pflanzenlinienspezifische Gruppen der Profile erkennbar. So konnten zwischen Ler und *cer9* sowie zwischen Ler und *cer1* in 2010 pflanzenlinienspezifische Cluster der DGGE-Profile beobachtet werden. Der Vergleich zwischen *cer1* und *cer6* ergab hier keine geschlossenen Cluster. Zudem wurde kein Vergleich zwischen dem Wildtyp und der *cer6*-Mutante durchgeführt. Auch war in diesem Jahr die *cer16*-Mutante noch nicht in die Versuche einbezogen worden. Im Jahr 2011 jedoch wurden alle Mutantenlinien inklusive der *cer16* mit dem Wildtyp verglichen und wiesen pflanzenlinienspezifische Cluster der DGGE-Profile auf (Abb. 34, Abb. 35). Weitergehende statistische Analysen der Profile des Jahres 2011 zeigten, dass die bakteriellen Gemeinschaften aller Pflanzenlinien im paarweisen Vergleich zueinander signifikant unterschiedlich waren (Tab. 7), auch wenn die Gemeinschaften von *cer1*, *cer6* und dem Wildtyp in einer NMDS-Analyse teilweise zu überlappen schienen (Abb. 36). Insgesamt machten die DGGE-Analysen deutlich, dass die bakteriellen Gemeinschaften der fünf Pflanzenlinien sich zumindest teilweise voneinander

unterschieden. Diese Clusterbildung ließ sich in zwei unabhängigen Versuchsreihen (2010 und 2011) reproduzieren, selbst wenn die Phylotypen der bakteriellen Gemeinschaften vermutlich nicht vollständig übereinstimmten (Abschnitt 4.4.2).

Eine solche Differenzierung von bakteriellen Gemeinschaften ist bereits für Vergleiche verschiedener Pflanzenarten mithilfe von Klonbibliotheken und DGGE-Analysen beschrieben worden (Lambais et al. 2006, Izhaki et al. 2013, Delmotte et al. 2009, Yang et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften offenbar charakteristisch für bestimmte Pflanzenarten sein kann. Allerdings ist auch bekannt, dass die Gemeinschaften durch weitere Einflüsse, wie z.B. den geographischen Ort, die Jahreszeit oder einen Befall durch pathogene Pilze bestimmt werden können (Williams et al. 2013, Knief et al. 2010a, Suda et al. 2009, Redford & Fierer 2009). Auch auf unterschiedlichen Sorten verschiedener Nutzpflanzenspezies wurden genotypspezifische bakterielle Gemeinschaften gefunden (Whipps et al. 2008, Correa et al. 2007, Hunter et al. 2010). Bislang existieren jedoch nur sehr wenige Studien, die versuchen die Faktoren, welche eine Differenzierung der Gemeinschaft bewirken, zu untersuchen. Hunter et al. (2010) schlossen aus ihren Untersuchungen, dass die bakteriellen Gemeinschaften auf verschiedenen Salat-Kultivaren von Eigenschaften der Blätter wie deren Gehalt an Wasser und gelösten Kohlehydraten, Blattfarbe, Blattstruktur, der Höhe der Pflanzen etc. beeinflusst werden. Trotzdem ist über weitere Faktoren oder gar Wirkmechanismen bisher nichts bekannt. Die hier durchgeführten DGGE-Untersuchungen deuten klar in die Richtung, dass die chemische Zusammensetzung der Wachsoberfläche von Pflanzen als Einflussfaktor auf die bakterielle Gemeinschaft von Pflanzenoberflächen infrage kommt.

Amplicon-Pyrosequenzierung

Die bakteriellen Gemeinschaften der ausgewählten Pflanzenlinien wurden weiterhin mithilfe einer moderneren, genaueren Methode untersucht. Im Gegensatz zu DGGE-Analysen und anderen Fingerprinting-Methoden wurde über die Amplicon-Pyrosequenzierung die bakterielle Gemeinschaft in wesentlich größerem Umfang und größerer Tiefe erfasst (Pedrós-Alió 2012, Sogin et al. 2006, Abschnitt 3.1).

Insgesamt waren die analysierten Gemeinschaften auf den fünf Pflanzenlinien von moderater Diversität und ungleich verteilt (Tab. 8, Abb. 37). Im Vergleich zu Analysen bakterieller Gemeinschaften in Böden und auf Wurzeloberflächen sind die hier und in anderen Studien analysierten Gemeinschaften der Phyllosphäre aus wesentlich weniger Mitgliedern zusammengesetzt (Abb. 46, Bulgarelli et al. 2012, Lundberg et al. 2012, Delmotte et al. 2009, Kim et al. 2012), was mit den DGGE-Analysen übereinstimmt. Diese Diskrepanz zwischen der Diversität im Boden und in der Phyllosphäre wird meist durch extreme und lebenslimitierende Bedingungen in der Phyllosphäre und das sehr ungleich verteilte Nährstoffangebot erklärt (Vorholt 2012, Knief et al. 2012, Remus-Emsermann et al. 2012, Delmotte et al. 2009). Die am häufigsten sequenzierten Phylotypen waren Pseudomonadaceae und Sphingomonadaceae, was generell typisch für die Arabidopsis-Phyllosphäre zu sein scheint (Tab. 9, Delmotte et al. 2009, Vorholt 2012, Bodenhausen et al. 2013).

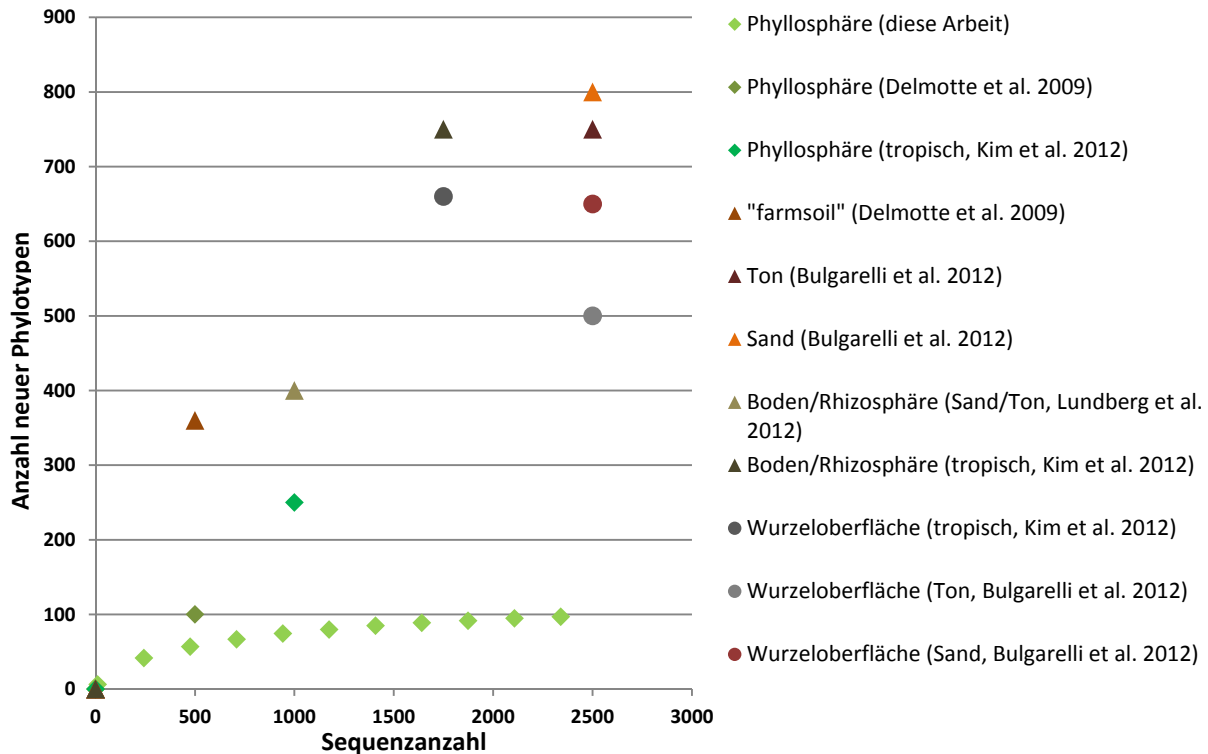


Abb. 46: Vergleich der gefundenen bakteriellen Phylotypen mit ansteigender Sequenzanzahl für die Phyllosphäre (◆), die Wurzeloberfläche (●) und verschiedene Bodentypen (▲). Die Daten wurden Abbildungen aus den angegebenen Publikationen entnommen.

Für eine Analyse der Betadiversität ist von Bedeutung, welcher Teil des Gesamtdatensatzes in der jeweiligen Analyse betrachtet wird. Von einigen Autoren wurde eingeführt, nur solche OTUs zu betrachten, deren Sequenzanteil einen bestimmten prozentualen Anteil aller gefundenen Sequenzen ausmacht (Bulgarelli et al. 2012, Lundberg et al. 2012). Dieses Vorgehen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, da bekannt ist, dass in einer DNA-Mischung unterschiedlicher Bakterien, aufgrund von Primer-Präferenzen und anderen PCR-Ungenauigkeiten, unterschiedliche Phylotypen quantitativ nicht gleichmäßig amplifiziert und sequenziert werden (Lee et al. 2012, Amend et al. 2010). Gering amplifizierbare Phylotypen und auch solche, die nicht auf allen Pflanzenlinien präsent waren, würden dadurch ausgeschlossen, obwohl sie wichtige Informationen enthalten könnten. Um möglicherweise ungerechtfertigte Gewichtungen zu vermeiden, wurden zudem die Daten nur hinsichtlich der An- oder Abwesenheit oder der relativen Abundanz der jeweiligen OTUs analysiert. In dieser Arbeit wurde der Datensatz ausschließlich nach Kriterien der Präsenz von Phylotypen in einer bestimmten Anzahl von Replikaten reduziert.

Natürlich liegt dem Kriterium der An- und Abwesenheit von Phylotypen eine künstliche Nachweisgrenze zugrunde. OTUs, die in einzelnen Replikaten nicht gefunden wurden, könnten möglicherweise trotzdem dort vorliegen, wurden jedoch aufgrund zu geringer Abundanz nicht sequenziert. Eine sehr ungleiche Sequenziertiefe einzelner Replikate könnte also bei einer statistischen Auswertung zu falschen Rückschlüssen führen (Gihring et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit waren die einzelnen Replikate jedoch relativ ähnlich tief sequenziert worden (2343 bis 10.010 Sequenzen pro Replikat). Zudem wurden, um diesem Problem zu begegnen, alle statistischen Analysen des Amplicon-Datensatzes mit einem rarifizierten (also unterbeprobten) Datensatz als Grundlage durchgeführt. Damit war die Nachweisgrenze für alle Proben vergleichbar und die

entsprechenden Ergebnisse spiegelten die tatsächlichen Unterschiede in der bakteriellen Besiedelung wieder.

Der umfassendste Überblick über alle Gemeinschaften wurde erreicht, indem alle OTUs betrachtet wurden, die auf mindestens zwei Replikaten der Gesamtanalyse bzw. mindesten zwei Replikaten einer Pflanzenlinie auftraten. Dabei zeigten die NMDS- und ANOSIM-Analysen pflanzenlinienspezifische Cluster, die für die einzelnen Linien mehr oder weniger stark ausgeprägt waren (Abb. 38, Abb. 39, Tab. 10, Tab. 11). So fielen die Replikat-Gemeinschaften der Pflanzenlinien *Ler*, *cer1*, *cer9* und *cer16* in jeweils eigene Bereiche des NMDS-Koordinatensystems, die *cer6* Linie allerdings konnte schlechter abgegrenzt werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die bakteriellen Gemeinschaften der einzelnen Pflanzenlinien unterschiedlich voneinander waren.

Betrachtete man nun die „konstanten“ OTUs, die sich in jeder der drei Replikat-Gemeinschaften mindestens einer Pflanzenlinie nachweisen ließen, reduzierte sich der Datensatz auf 79 OTUs (Tab. 12, Abb. 40, Abb. 41). Alle anderen OTUs wurden als transiente Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaften angesehen, da sie nur auf höchstens zwei Replikaten jeder Pflanzenlinie anzutreffen waren. Die konstanten bakteriellen Gemeinschaften auf den fünf Pflanzenlinien enthielten Proteobakterien, Bacteroidetes und Actinobakterien (Abb. 40). Doch bereits auf Phylumbene zeigten sich Unterschiede in der An- und Abwesenheit bestimmter Phyla (z.B. *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*). Bei genauerer Betrachtung (Abb. 41) konnte eine bakterielle Kerngemeinschaft definiert werden, deren Mitglieder auf allen oder fast allen Replikaten jeder Pflanzenlinie vorhanden waren. Diese bestand unter anderem aus *Sphingomonadales*-, *Rhizobiales*-, *Mesorhizobium*-, *Methylobacterium*-, *Flavobacterium*- und *Pseudomonas*-OTUs – bakterielle Phylotypen, die aus der Phyllosphäre von *A. thaliana* wohlbekannt sind (Vorholt 2012, Bodenhausen et al. 2013, Kniskern et al. 2007). Auch in der Phyllosphäre anderer Pflanzenarten sind Phylotypen dieser taxonomischen Gruppen häufig anzutreffen (Vorholt 2012, Rastogi et al. 2012, Yashiro et al. 2011, Lopez-Velasco et al. 2011), jedoch nicht immer in Kombination. Bereits auf *A. thaliana*-Samen wurden *Sphingomonas*-, *Methylobacterium*- und *Rhizobium*-Arten gefunden (Truyens et al. 2013). In einem Vergleich des Samen-Mikrobioms mit der Phyllosphäre der späteren Pflanzen wurden auf Spinat z.B. *Sphingomonadales* und *Methylobacteriaceae* erst im 3-4-Blatt-Stadium gefunden (Lopez-Velasco et al. 2013). Das könnte darauf hinweisen, dass einige der gefundenen Arten bereits im Samen der *A. thaliana*-Pflanzen vorliegen, wohingegen andere möglicherweise generalistische Besiedler von Pflanzen sind, die sich auf verschiedenen Arten früher oder später einfinden. Somit werden die Mitglieder der Kerngemeinschaft aller Pflanzenlinien offenbar nicht durch die Wachsbiosynthese-Mutationen der jeweiligen Pflanzenlinien beeinflusst.

In den konstanten Gemeinschaften der verschiedenen Pflanzenlinien lagen auch pflanzenlinienspezifisch auftretende Phylotypen vor (Tab. 12, Abb. 41). Diese waren auf einer oder mehreren Pflanzenlinien Teil der konstanten Gemeinschaft, während sie auf anderen Pflanzenlinien vollständig fehlten. Sie wurden in Abbildung 44 abzüglich aller potentiellen Chimären nochmals in ihrer Pflanzenlinienzugehörigkeit dargestellt. Dabei wurden die auf den jeweiligen Pflanzenlinien spezifisch an- bzw. abwesenden Phylotypen soweit möglich benannt. Taxonomisch ließen sich die sequenzabundantesten OTUs hiervon als *Ralstonia*, *Rhodovastum*, *Rhodococcus*, *Luteimonas*, *Balneimonas*, *Shingomonas*, *Gemmatimonas*, *Limnobacter*, *Brevundimonas*, *Aquicella*, *Bosea*, *Nocardioides*, *Methylophilaceae* oder *Alphaproteobacteria* einordnen. Einige dieser Phylotypen (*Shingomonas*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, *Balneimonas*) sind als Besiedler verschiedener Pflanzen bekannt (Vorholt 2012, Redford et al. 2010, Tuyens et al. 2013, Finkel et al. 2012, Lopez-

Velasco et al. 2011). *Rhodococcus*, *Bosea* und *Ralstonia* wurden bereits als Degradierer unterschiedlicher komplexer Umweltchemikalien beschrieben (Ryan et al. 2012, Shin et al. 2012, Larkin et al. 2005). *Rhodovastum* und die hier gering abundant gefundene Gattung *Deinococcus* wurden als photoorganotrophe bzw. extremophile Bakterien beschrieben (Minton 1994, Okamura et al. 2009). Diese Eigenschaften könnten zu einem Überleben der Bakterien in der Phyllosphäre beitragen. Zudem könnten solche Bakterien sehr spezielle Nischen besetzen, die generalistischen Besiedlern unter Umständen nicht zugänglich wären.

Auffällig war bei der Betrachtung der Verteilung der pflanzenlinienspezifisch an- bzw. abwesenden Phylotypen, dass auf dem Ler-Wildtyp lediglich ein Phylotyp spezifisch anwesend gefunden wurde, wohingegen auf *cer1*, *cer9* und *cer16* fünf bzw. sieben Phylotypen spezifisch in der konstanten Gemeinschaft der Pflanzenlinien vorlagen (Abb. 44). Das umgekehrte Bild präsentierte sich in den spezifisch abwesenden Phylotypen, die auf einer Pflanzenlinie fehlten, wohingegen sie auf allen anderen Linien in mindestens einem Replikat vorhanden waren. Hier wurden auf dem Wildtyp drei Phylotypen nicht gefunden, auf *cer1*, *cer9* und *cer16* jeweils nur einer bzw. zwei. Die *cer6*-Linie scheint hierbei dem Wildtyp ähnlicher zu sein, als die anderen Pflanzenlinien – es wurden hier nur zwei Phylotypen spezifisch anwesend gefunden und drei Phylotypen spezifisch abwesend. Auf dem Wildtyp und bedingt auch auf der *cer6*-Mutante scheinen sich also weniger Phylotypen pflanzenlinienspezifisch angesiedelt zu haben. Möglicherweise zeigt sich hier ein bakterienreduzierender Effekt der Wildtyp-Wachse, der sich auf einzelne Phylotypen auswirkt. Eine ähnliche Beobachtung wurde mit inokulierten Bakterien auf Mais-Mutanten gemacht (Marcell & Beattie 2002). Dort entwickelten sich auf dem zugehörigen Wildtyp im Vergleich weniger große Bakterienpopulationen als auf manchen Mutanten, was hier jedoch ausschließlich über die strukturellen Veränderungen der Wachskristallaufgabe erklärt wurde.

Auch durch statistische Analysen ließen sich die beobachteten Unterschiede in den konstanten bakteriellen Gemeinschaften der einzelnen Pflanzenlinien bestätigen (Abb. 42, Abb. 43, Tab. 13). So wurden in der NMDS-Analyse Gruppen der Replikate der fünf Pflanzenlinien in jeweils eigenen Bereichen festgestellt. Zudem zeigte die UniFrac-Cluster-Analyse, die auch phylogenetische Information mit einbezieht, ein eindeutiges Clustern der Pflanzenlinien *cer6*, *cer9* und *cer16*. Diese Ergebnisse und auch ein Mantel-Test machten deutlich, dass die Unterschiede in der Wachszusammensetzung der untersuchten Pflanzenlinien mit einer Differenzierung der bakteriellen Gemeinschaft korrelierten. Dabei gilt es zu bedenken, dass die Variabilität zwischen den einzelnen Replikaten der Pflanzenlinien vergleichsweise hoch war. Das ist auch in einer Untersuchung von bakteriellen Phyllosphärengemeinschaften von Bäumen beobachtet worden (Redford et al. 2010). Die Variabilität lässt sich durch die Heterogenität der Pflanzenoberfläche in Bezug auf Nahrungsverfügbarkeit, Umwelteinflüsse und den Einwanderungsprozess von Bakterien erklären (Remus-Emsermann et al. 2012, Vorholt 2012, Leveau 2006, Beattie & Lindow 1999). Dennoch macht die Beobachtung deutlich, dass für Untersuchungen von Phyllosphärenmikrobiomen eine hohe Anzahl von Replikaten vorteilhaft ist. Die hier durchgeführten Untersuchungen stoßen diesbezüglich bereits an statistische Untergrenzen, jedoch können die präsentierten Ergebnisse als wichtige erste Hinweise auf einen Einfluss der Wachszusammensetzung von Pflanzen auf deren bakterielle Besiedlung betrachtet werden.

Obwohl die statistischen Auswertungen differenzierte bakterielle Gemeinschaften auf den verschiedenen Pflanzenlinien belegen, können keine konkreten Aussagen über Mechanismen gemacht werden, die eine solche Differenzierung bewirken. Die Wachszusammensetzung von

Pflanzen ist generell sehr komplex. Das bedeutet wiederum, dass keine der Komponenten isoliert betrachtet werden kann. Die Erhöhung oder Erniedrigung einer Wachskomponente ging bei den untersuchten Pflanzenlinien immer auch mit Erhöhungen oder Erniedrigungen anderer Komponenten einher. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, in welcher Weise die Wachszusammensetzung die bakterielle Besiedelung der Pflanzenlinien beeinflussen könnte. So ist bekannt, dass die Wachszusammensetzung die Benetzbarkeit von Blättern mitbestimmt, wodurch auch die Anheftung von Bakterien beeinflusst werden könnte (Beattie 2002, Neinhuis & Barthlott 1998, Marcell & Beattie 2002). Zudem könnten von Bakterien synthetisierte, oberflächenaktive Proteine oder Effektoren, die die Durchlässigkeit der pflanzlichen Kutikula erhöhen, veränderte Wirkungen haben (Burch et al. 2011, Schreiber et al. 2005, Knoll & Schreiber 2000, Brandl & Lindow 1998, Krimm et al. 2005). Auch könnte die Diffusion von *quorum-sensing*-Signalen der Bakterien auf einer veränderten Oberfläche anders als auf dem Wildtyp verlaufen (Hartmann & Schikora 2012). Eine unterschiedliche Wachszusammensetzung könnte auch die Durchlässigkeit der Kutikula für Wasser und gelöste Substanzen, die als Nahrung für Bakterien dienen oder diese abwehren, verändern (Beattie 2011, Vogg et al. 2004).

Auch unmittelbare Effekte der Wachszusammensetzung auf Bakterien sind nicht auszuschließen: So könnten Wachse als Barriere wirken oder auch chemisch antimikrobielle Wirkung entfalten (Shanker et al. 2007). Alternativ könnten sie auch als Nahrungsquelle für spezialisierte Bakterien fungieren (Samanta et al. 1986). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde zudem festgestellt, dass bestimmte bakterielle Phylotypen offenbar in der Lage sind, isolierte Komponenten wie C₁₆- und C₂₂-Alkan, die auch im Wachs vieler Pflanzen auftreten können, als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Abschnitt 4.2.3). Diese Beobachtung steht im Einklang mit Berichten, die das Wachstum ursprünglich pflanzenassoziiertes, bakterieller Isolate auf Medien, die mit bestimmten Wachsbestandteilen angereichert waren, beschreiben (Hankin & Kolattukudy 1968, Samanta et al. 1986, Yousaf et al. 2010, Ilori et al. 2010). Eine solche Verwendung pflanzlicher Wachse durch Bakterien wäre ein leicht vorstellbarer Mechanismus, da pflanzliches Material inklusive seiner Wachse auch im Boden von Bakterien und anderen Mikroorganismen zersetzt wird (Schulz et al. 2012). Dennoch wurde beim Versuch der Inkubation eines der Alkan-degradierenden Isolate mit isolierten Birnenkutikeln kein offensichtliches Wachstum der Bakterien festgestellt (Abb. 21). Zum einen könnte das daran liegen, dass Birnenwachse Triterpenoide enthalten, die vielfach eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (Awanchiri et al. 2009, Innocent et al. 2011, Xia et al. 2012). Möglicherweise spielen aber auch weitere Faktoren, wie die Komplexität der Wachszusammensetzung eine Rolle.

Als weiterer Einflussfaktor auf die bakterielle Gemeinschaft auf Pflanzenoberflächen sind auch synergistische oder antagonistische Effekte der Bakterien untereinander zu berücksichtigen. So wurde in *Methylobacterium*-Gemeinschaften beobachtet, dass manche Stämme in kompetitiven Situationen größere Zellzahlen erreichen als in Einzelinokulationen (Knief et al. 2010b). Auch sind antagonistische Effekte bestimmter *Azospirillum*- und *Bacillus*-Stämme auf Pflanzenpathogene bekannt (Bashan & de Bashan 2002, Huang et al. 2012) und von bestimmten *Sphingomonas*-Stämmen wurde berichtet, dass sie negative Effekte auf pflanzenpathogene *Pseudomonas syringae* ausüben können (Innerebner et al. 2011, Vogel et al. 2012). Somit kann hier ein Einfluss der Wachse auf bestimmte Phylotypen, Konsequenzen für andere Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft haben.

5.4 Zentrale Aussagen

1. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht-drüsige Trichome von *A. thaliana* keine wesentlichen Auswirkungen auf die bakteriellen Phyllosphärengemeinschaften hatten. Da Trichome in ihrer Form und Funktion auf Pflanzen sehr unterschiedlich sein können, sind diese Ergebnisse jedoch nicht als allgemeingültig zu betrachten.

2. Weiterhin wurde die pflanzliche Wachszusammensetzung als möglicher Selektionsfaktor für bakterielle Oberflächengemeinschaften untersucht. Neben einer auf allen Pflanzenlinien anwesenden Kerngemeinschaft von 13 OTUs (z.B. Sphingomonadales, *Emticicia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*), wurden 35 bakterielle Phylotypen spezifisch auf einzelnen Pflanzenlinien nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zusammensetzung der kutikulären Wachse einer Pflanze deren bakterielle Besiedelung der Oberfläche mitbestimmt.

5.5 Ausblick

Die auf Pflanzen lebenden Mikroorganismen tragen ebenso wie boden- oder wasserlebende Mikroorganismen zu globalen Stoffkreisläufen bei. Auch wir Menschen kommen täglich mit besiedelten Pflanzenoberflächen in Berührung oder verzehren sie sogar. Somit stellen sie einen wichtigen Teil unserer Umwelt dar, dessen Verständnis von großer ökologischer Bedeutung ist. Zudem kann erweitertes Wissen über das Phyllosphärenhabitat zu größerer Sicherheit bei der Nahrungsmittelproduktion führen und dazu beitragen, Infektionen von Nutzpflanzen mit phytopathogenen Bakterien mit geringerem Einsatz chemischer Wirkstoffe einzudämmen.

Für nachfolgende Arbeiten wäre es interessant, die in dieser Arbeit gewonnenen bakteriellen Isolate für mechanistische Studien zu nutzen. Durch gezielte Inokulation und Analyse der Etablierung von Isolaten könnten wertvolle Einblicke in die Reaktion einzelner bakterieller Stämme auf variable Oberflächeneigenschaften gewonnen werden. Zudem könnte von inokulierten Stämmen, die Reaktionen auf unterschiedlichen Oberflächen zeigen, eine Transkriptomanalyse hinsichtlich differentiell exprimierter Gene und damit betroffener Lebensprozesse der Bakterien durchgeführt werden.

In diesem Zusammenhang wäre auch der Aspekt der Nutzung pflanzlicher Wachse als Nahrungsquelle für Bakterien interessant. Gene für erste Schritte des bakteriellen Alkanabbaus sind aus der Forschung zum Abbau von Ölverschmutzungen und der Degradierung von Blattabfall im Boden bekannt. Es könnte untersucht werden, ob solche Gene auch auf lebenden Pflanzenoberflächen exprimiert werden. Kombiniert mit Inokulationsexperimenten könnte die Reaktion von Bakterien auf komplexe Gemische pflanzlicher Wachskomponenten untersucht werden. Eventuell ließe sich hiermit die Frage klären, warum pflanzliche Wachse trotz bakterieller Besiedelung nicht vollständig abgebaut werden, solange die Pflanzenteile leben.

Weiterhin könnten durch den Einsatz von FISH-Sonden bestimmte bakterielle Phylotypen und ihre Verbreitungsmuster auf den Blättern visualisiert werden. Parallel dazu könnte durch Profilierung der Verteilung kutikulärer Wachskomponenten und Oberflächencharakteristika im Nanometerbereich versucht werden, eine genaue topographische Karte des Habitats zu erstellen. Solche Versuche würden das Zusammenleben und die räumliche Etablierung bestimmter Bakterien sowie ihre mögliche Abhängigkeit von bestimmten ortsspezifischen Merkmalen näher beleuchten.

Die bestehenden bakteriellen Isolate könnten außerdem auf pflanzenwachstumsfördernde oder pflanzenpathogenhemmende Wirkungen getestet werden. Dazu müssten die einzelnen Isolate inokuliert und das Pflanzenwachstum dokumentiert werden. Durch Overlay-Assays mit bekannten phytopathogenen Bakterien und gegebenenfalls nachfolgende Untersuchungen könnten Isolate selektiert werden, die möglicherweise Pflanzen gegen Krankheitserreger schützen. Solche Versuche würden Beiträge zum biologischen Pflanzenschutz und zum besseren Verständnis der komplexen Lebensgemeinschaften auf pflanzlichen Oberflächen liefern.

Auch aus Sicht des pflanzlichen Partners ließen sich Bakterien-Pflanzen-Interaktion weiter aufklären. Dazu könnten *A. thaliana*-Linien mit gezielten und gut charakterisierten Mutationen verschiedener funktioneller Aspekte dazu genutzt werden, Einflussfaktoren auf die bakterielle Gemeinschaft genauer einzugrenzen. Über die Untersuchung der bakteriellen Diversität dieser Mutanten würde man zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Faktoren gewinnen, die das bakterielle Zusammenleben in der Phyllosphäre beeinflussen. Bislang werden viele Schlussfolgerungen und

Erklärungsansätze über das Phyllosphärenhabitat eingebracht, jedoch sind viele Aspekte der bakteriellen Ansiedelung und Etablierung bislang experimentell nicht untermauert.

6. Literaturverzeichnis

Die Zeitschriftenabkürzungen entsprechen dem NLM (National Library of Medicine)-Standard.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol Ecol* 19: 5555-5565.

Atamna-Ismael N, Finkel OM, Glaser F, Sharon I, Schneider R, Post AF, Spudich JL, von Mehring C, Vorholt JA, Iluz D, Béjà O, Belkin S (2012) Microbial rhodopsins on leaf surfaces of terrestrial plants. *Environ Microbiol* 14: 140-146.

Awanchiri SS, Trinh-Van-Dufat H, Shirri JC, Dongfack MDJ, Nguenang GM, Boutefnouchet S, Fomum ZT, Seguin E, Verite P, Tillequin F, Wandji J (2009) Triterpenoids with antimicrobial activity from *Drypetes inaequalis*. *Phytochemistry* 70: 419-423.

Baker EA (1974) The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleraceae* var. *gemmifera*. *New Phytol* 73: 955-966.

Baldotto LEB, Olivares FL (2008) Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Can J Microbiol* 54: 918-931.

Barak JD, Kramer LC, Hao L-Y (2011) Plant cultivar alters *Salmonella enterica* colonization of tomato and Type I trichomes are preferential colonization sites. *Appl Environ Microbiol* 77: 498-504.

Barthlott W, Neinhuis C (1997) Purity of sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202: 1-8.

Bashan Y, de-Bashan LE (2002) Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*. *Appl Environ Microbiol* 68: 2637-2643.

Beattie GA (2011) Water relations in the interaction of foliar bacterial pathogens with plants. *Annu Rev Phytopathol* 49: 533-555.

Beattie GA, Lindow SE (1995) The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu Rev Phytopathol* 33: 145-172.

Beattie GA, Lindow SE (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89: 353-359.

Beattie GA, Marcell LM (2002) Effect of alterations in cuticular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces. *Plant Cell Environ* 25: 1-16.

Beattie, GA (2002) Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. In: Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ, editors. *Phyllosphere Microbiology*. St. Paul: APS Press. pp. 3-26.

- Behnke A, Engel M, Christen R, Nebel M, Klein RR, Stoeck T (2011) Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions. *Environ Microbiol* 13: 340-349.
- Beninger CW, Abou-Zaid MM (1997) Flavonol glycosides from four pine species that inhibit early instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) development. *Biochem Syst Ecol* 25: 505-512.
- Bernard A, Joubès J (2013) Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Prog Lipid Res* 52:110–129.
- Bodenhausen N, Horton M, Bergelson J (2013) Bacterial communities associated with the leaves and roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8: 2 e56329.
- Bonder MJ, Abeln S, Zaura E, Brandt BW (2012) Comparing clustering and pre-processing in taxonomy analysis. *Bioinformatics* 28: 2892-2897.
- Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Léger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, Lessire R, Joubès J (2011) Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 156: 29-45.
- Brandl MT, Lindow SE (1998) Contribution of indole- 3 acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3256–3263.
- Brockman W, Alvarez P, Young S, Garber M, Giannoukos G, Lee WL, Russ C, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB (2008) Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Res* 18: 763-770.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P (2012) Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488: 91-95.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* 64: 807-838.
- Burch AY, Browne PJ, Dunlap CA, Price NP, Lindow SE (2011) Comparison of biosurfactant detection methods reveals hydrophobic surfactants and contact-regulated production. *Environ Microbiol* 13: 2681–2691.
- Buschhaus C, Jetter R (2012) Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves: β -Amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiol* 160: 1120-1129.
- Cafati CR, Saettler AW (1980) Effect of host on multiplication and distribution of bean common blight bacteria. *Phytopathology* 70: 675-679.
- Calo L, García I, Gotor C, Romero LC (2006) Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3-glucanase. *J Exp Bot* 57: 3911-3920.
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26: 266–267.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald

- D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widman J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335–336.
- Chelius MK, Triplett EW (2001) The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* 41: 252-263.
- Chelius MK, Triplett EW (2000) *Dyadobacter fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from surface-sterilized *Zea mays* stems. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 751-758.
- Chi F, Shen S-H, Cheng H-P, Jing Y-X, Yanni YG, Dazzo FB (2005) Ascending migration of endophytic Rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol* 71: 7271-7278.
- Choudhary DK, Johri B (2008) Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR) *Microbiol Res* 164: 493-513.
- Corpe WA, Rheem S (1989) Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 243-250.
- Correa OS, Romero AM, Montecchia MS, Soria MA (2007) Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. *J Appl Microbiol* 102: 781-786.
- Curstedt T (1974) Mass spectra of trimethylsilyl ethers of +H-labelled mono- and diglycerides. *Biochim Biophys Acta* 360: 12-23.
- Dalin P, Ågren J, Björkman C, Huttunen P, Kärkkäinen K (2008) Leaf trichome formation and plant resistance to herbivory. In: Schaller A (ed) *Induced plant resistance to herbivory*. Springer Science+Business Media B.V. pp. 89-105.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C, Vorholt JA (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16428–16433.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069–5072.
- Domingues PM, Louvado A, Oliveira V, Coelho FJ, Almeida A, Gomes NC, Cunha A (2013) Selective cultures for the isolation of biosurfactant producing bacteria: comparison of different combinations of environmental inocula and hydrophobic carbon sources. *Prep Biochem Biotechnol* 43: 237-255.
- Dos Santos Pereira A, de Aquino Neto FR (2003) Chemical composition of *Tipuana tipu*, a source for tropical honey bee products. *Z Naturforsch C* 58: 201-206.
- Dulla GFJ, Lindow SE (2009) Acyl-homoserine lactone-mediated cross talk among epiphytic bacteria modulates behavior of *Pseudomonas syringae* on leaves. *ISME J* 3: 825-834.
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461.
- Ehleringer, JR (1984) Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: *Biology and chemistry of plant trichomes*, E Rodrigues, PL Healy, I Mehta (eds) New York: Plenum Press. pp. 113-132.

- Fall R, Benson AA (1996) Leaf methanol – the simplest natural product from plants. *Trends Plant Sci* 1: 296-301.
- Finkel OM, Burch AY, Elad T, Huse SM, Lindow SE, Post AF, Belkin S (2012) Distance-decay relationships partially determine diversity patterns of phyllosphere bacteria on Tamarix trees across the Sonoran Desert. *Appl Environ Microbiol* 78: 6187-6193.
- Finkel OM, Burch AY, Lindow SE, Post AF, Belkin S (2011) Geographical location determines the population structure in phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree. *Appl Environ Microbiol* 77: 7647–7655.
- Fürnkranz M, Wanek W, Richter A, Abell G, Rasche F, Sessitsch A (2008) Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J* 2: 561-570.
- Gihring TM, Green SJ, Schadt CW (2012) Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol* 14: 285-290.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- Glenn TC (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 11: 759-769.
- Gourion B, Rossignol M, Vorholt JA (2006) A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13186-13191.
- Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methé B, DeSantis TZ, Human Microbiome Consortium, Petrosino JK, Knight R, Birren BW (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* 21: 494–504.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4,1: 4.
- Handelsman J, Smalla K (2003) Conversations with the silent majority. *Curr Opin Microbiol* 6: 271-273.
- Hankin L, Kolattukudy PE (1968) Metabolism of a plant wax paraffin (n-nonacosane) by a soil bacterium (*Micrococcus ceripicans*). *J Gen Microbiol* 51: 457-463.
- Hansjakob A, Bischof S, Bringmann G, Riederer M, Hildebrandt U (2010) Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose- and chain length-dependent manner. *New Phytol* 188: 1039-1054.
- Hartmann A, Schikora A (2012) Quorum sensing of bacteria and trans-kingdom interactions of N-acyl homoserine lactones with eukaryotes. *J Chem Ecol* 38: 704–713.
- Hauke V, Schreiber L (1998) Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. *Planta* 207: 67-75.
- Hauser M-T, Harr B, Schlötterer C (2001) Trichome distribution in *Arabidopsis thaliana* and its close relative *Arabidopsis lyrata*: Molecular analysis of the candidate gene *GLABROUS1*. *Mol Biol Evol* 18: 1754-1763.

- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8: 15-25.
- Hirano SS, Upper CD (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 624-653.
- Holland MA, Polacco JC (1994) PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 197-209.
- Holloway PJ (1970) Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pestic Sci* 1: 156-163.
- Huang T-P, Tzeng DD-S, Wong ACL, Chen C-H, Lu K-M, Lee Y-H, Huang W-D, Hwang B-F, Tzeng K-C (2012) DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to *Citrus* bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *PLoS ONE* 7: e42124.
- Hunter PJ, Hand P, Pink D, Whipps JM, Bending GD (2010) Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 76: 8117–8125.
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 12: 1889-1898.
- Ilori MO, Amund OO, Ezeani CJ, Omoijahina S, Adebusoye SA (2006) Occurrence and growth potential of hydrocarbon degrading bacteria on the phylloplane of some tropical plants. *Afr J Biotechnol* 5: 542-545.
- Innerebner G, Knief C, Vorholt JA (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol* 77: 3202-3210.
- Innocent E, Shah T, Nondo RSO, Moshi MJ (2011) Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from *Lantana viburnoides* ssp. *viburnoides* var. *kisi*. *Spatula* DD 1: 213-218.
- Izhaki I, Fridman S, Gerchman Y, Halpern M (2013) Variability of bacterial community composition on leaves between and within plant species. *Curr Microbiol* DOI 10.1007/s00284-012-0261-x *in press*.
- Jacobs JL, Sundin GW (2001) Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl Environ Microbiol* 67: 5488-5496.
- Jakoby MJ, Falkenhan D, Mader MT, Brininstool G, Wischnitzki E, Platz N, Hudson A, Hülkamp M, Larkin J, Schnittger A (2008) Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that *NOECK* encodes the MIXTA-like transcriptional regulator MYP106. *Plant Physiol* 148: 1583-1602.
- Jeffree CE (2006) The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the Plant Cuticle*, Annual Plant Reviews, Vol. 23. Oxford: Blackwell. pp. 11-125.
- Jenks MA, Eigenbrode SD, Lemieux B (2002) Cuticular waxes of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 1: e0016.
- Jenks MA, Tuttle HA, Eigenbrode SD, Feldmann KA (1995) Leaf epicuticular waxes of the *eceriferum* mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108: 369-377.
- Jenks MA, Tuttle HA, Feldmann KA (1996) Changes in epicuticular waxes on wildtype and *eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. *Phytochemistry* 42: 29-34.
- Jetter R, Kunst L, Samuels AL (2006) Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer M, Müller C, editors. *Biology of the Plant Cuticle*, Annual Plant Reviews, Vol. 23. Oxford: Blackwell. pp. 145–181.

- Ji P, Wilson M (2002) Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato. *Appl Environ Microbiol* 68: 4383-4389.
- Johnson HB (1975) Plant pubescence: an ecological perspective. *Bot Rev* 41: 233–253.
- Junker RR, Loewel C, Gross R, Dötterl S, Keller A, Blüthgen N (2011) Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biol* 13: 918-924.
- Kim M, Singh D, Lai-Hoe A, Go R, Rahim RA, A.N. A, Chun J, Adams JM (2012) Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. *Microb Ecol* 63: 674–681.
- Kinkel LL, Wilson M, Lindow SE (1995) Effect of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. *Microb Ecol* 29: 283-297.
- Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering C, Vorholt JA (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J* 6: 1378-1390.
- Knief C, Delmotte N, Vorholt J (2011) Bacterial adaption to life in association with plants – a proteomic perspective from culture to in situ conditions. *Proteomics* 11: 3086-3105.
- Knief C, Frances L, Vorholt JA (2010b) Competitiveness of diverse *Methylobacterium* strains in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and identification of representative models, including *M. extorquens* PA1. *Microb Ecol* 60: 440-452.
- Knief C, Ramette A, Frances L, Alonso-Blanco C, Vorholt JA (2010a) Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME J* 4: 719–728.
- Kniskern JM, Traw MB, Bergelson J (2007) Salicylic acid and jasmonic acid signalling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 1512-1522.
- Knoll D, Schreiber L (2000) Plant-microbe interactions: Wetting of Ivy (*Hedera helix* L.) leaf surfaces in relation to colonization by epiphytic microorganisms. *Microb Ecol* 41: 33–42.
- Koornneef M, Hanhart CJ, Thiel F (1989) A genetic and phenotypic description of eceriferum (cer) mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Hered* 80: 118–122.
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, Joubès J, Jenks MA (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 1918–1929.
- Krimm U, Abanda-Nkpwatt D, Schwab W, Schreiber L (2005) Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. *FEMS Microbiol Ecol* 53: 483-492.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12: 18-123.
- Kunst L, Jetter R, Samuels AL (2006) Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the Plant Cuticle*, Annual Plant Reviews, Vol. 23. Oxford: Blackwell. pp. 181-214.

- Kürkcüoglu S, Degenhardt J, Lensing J, Al-Masri AN, Gau AE (2007) Identification of differentially expressed genes in *Malus domestica* after application of the non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the phyllosphere. *J Exp Bot* 58: 733-741.
- Kutschera U (2007) Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts – a hypothesis. *Plant Signal Behav* 2: 74-78.
- Lambais MR, Crowley DE, Cury JC, Büll RC, Rodrigues RR (2006) Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. *SCIENCE* 312: 1917.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. London: Wiley. pp. 115–175.
- Larkin JC, Young N, Prigge M, Marks MD (1996) The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development* 122: 997-1005.
- Larkin MJ, Kulakov LA, Allen CCR (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol* 16: 282-290.
- Leben C (1988) Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. *Phytopathology* 78: 179-185.
- Lee CK, Herbold CW, Polson SW, Wommack KE, Williamson SJ, McDonald IR, Cary SC (2012) Groundtruthing next-gen sequencing for microbial ecology - biases and errors in community structure estimates from PCR amplicon pyrosequencing. *PLoS ONE* 7: 9 e44224.
- Leff JW, Fierer N (2013) Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLoS ONE* 8: e59310.
- Leveau JHJ (2006) Microbial communities in the phyllosphere. In: Riederer M, Müller C (eds) *Biology of the plant cuticle*. Oxford: Blackwell Publishing. Pp. 333-366.
- Leveau JHJ, Lindow SE (2001) Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3446-3453.
- Leveau JHJ, Tech JJ (2011) Grapevine microbiomics: Bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16 S rRNA amplicons. *Acta Hort (ISHS)* 905: 31-42.
- Li Y, Beisson F, Ohlrogge J, Pollard M (2007) Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase. *Plant Physiol* 144: 1267-1277.
- Lindow SE, Brandl MT (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69: 1875-1883.
- Logares R, Haverkamp THA, Kumar S, Lanzén A, Nederbragt AJ, Quince C, Kausserud H (2012) Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *J Microbiol Methods* 91: 106-113.
- Lopez-Velasco G, Carder PA, Welbaum GE, Ponder MA (2013) Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett* 346: 146-154.
- Lopez-Velasco G, Welbaum GE, Boyer RR, Mane SP, Ponder MA (2011) Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *J Appl Microbiol* 110: 1203-1214.

- Lü S, Zhao H, Des Marais DL, Parsons EP, Wen X, Xu X, Bangarusamy DK, Wang G, Rowland O, Juenger T, Bressan RA, Jenks MA (2012) *Arabidopsis* ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiol* 159: 930-944.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lüssmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32: 1363–1371.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86-90.
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT (2012) Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS ONE* 7: e30087.
- Ma A, Lv D, Zhuang X, Zhuang G (2013) Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from Tobacco. *Int J Mol Sci* 14: 14607-14619.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13: 614-629.
- Marcell LM, Beattie G (2002) Effect of leaf surface waxes on leaf colonisation by *Pantoea agglomerans* and *Clavibacter michiganensis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 1236-1244.
- Mechaber WL, Marshall DB, Mechaber RA, Jobe RT, Chew FS (1996) Mapping leaf surface landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4600-4603.
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW (1993) Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 1661-1668.
- Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 71: 7019-7028.
- Minton KW (1994) DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 13: 9-15.
- Monier JM, Lindow SE (2004) Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 70: 346–355.
- Morris CE, Barnes MB, McLean RJC (2002) Biofilms on leaf surfaces: Implications for the biology, ecology and management of populations of epiphytic bacteria. In: Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ, (eds) *Phyllosphere Microbiology*. St. Paul: APS Press. pp. 139-156.
- Morris CE, Monier JM, Jacques MA (1997) Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 63: 1570–76.
- Müller T, Ruppel S (2013) Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiol Ecol* 10.1111/1574-6941.12198 *in press*.

- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbial Ecology, Manual 3.4.4*. Dordrecht: Kluwer. pp. 1–27.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Neinhuis C, Barthlott W (1998) Seasonal changes of leaf surface contamination in beech, oak, and ginkgo in relation to leaf micromorphology and wettability. *New Phytol* 138: 91-98.
- Nhi-Cong LT, Mikolasch A, Awe S, Sheikhan H, Klenk H-P, Schauer F (2010) Oxidation of aliphatic, branched chain and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. *J Basic Microbiol* 50: 1-13.
- Ning J, Bai Z, Gang G, Jiang D, Hu Q, He J, Zhang H, Zhuang G (2010) Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of an organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. *FEMS Microbiol Lett* 306: 135-143.
- O'Brien HE, Thakur S, Guttman DS (2011) Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annu Rev Phytopathol* 49: 269-289.
- O'Brien RD, Lindow SE (1989) Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* 79: 619-627.
- Okamura K, Hisada T, Kanbe T, Hiraishi A (2009) *Rhodovastum atsumiense* gen. nov., sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from paddy soil. *J Gen Appl Microbiol* 55: 43-50.
- Oksanen JF, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, et al. (2012) Package 'vegan'. <http://cran.r-project.org>, <http://vegan.r-forge.r-project.org/>
- Pansarin ER, Salatino A, Pereira AS (2008) Micromorphological and chemical characteristics of cuticular waxes of *Cleistes* (Orchidaceae, Pogonieae). *Bol Bot Univ São Paulo* 26: 79-91.
- Pedrós-Alió C (2012) The rare bacterial biosphere. *Annu Rev Mar Sci* 4: 449-466.
- Poisot T, Péquin B, Gravel D (2013) High-throughput sequencing: A roadmap toward community ecology. *Ecol Evol* 3: 1125-1139.
- Prosser JI (2010) Replicate or lie. *Environ Microbiol* 12: 1806-1810.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35: 7188–7196.
- Quince C, Lanzén A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods* 6: 639-641.
- Quince C, Lanzén A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* 12: 38.
- Qvit-Raz N, Finkel OM, Al-Deeb TM, Malkawi HI, Hindiyeh MY, Jurkevitch E, Belkin S (2012) Biogeographical diversity of leaf-associated microbial communities from salt-secreting *Tamarix* trees of the Dead Sea region. *Res Microbiol* 163: 142-150.

- Rastogi G, Coaker GL, Leveau JHJ (2013) New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol Lett* DOI: 10.1111/1574-6968.12225 *in press*.
- Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, et al. (2012) Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J* 6: 1812–1822.
- Rastogi G, Tech JJ, Coaker GL, Leveau JHJ (2010) A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *J Microbiol Methods* 83: 127-132.
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* 12: 2885–2893.
- Redford AJ, Fierer N (2009) Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microb Ecol* 58: 189-198.
- Remus-Emsermann MNP, de Oliveira S, Schreiber L, Leveau JHJ (2011) Quantification of lateral heterogeneity in carbohydrate permeability of isolated plant leaf cuticles. *Front Microbiol* 2: 197.
- Remus-Emsermann MNP, Leveau JHJ (2010) Linking environmental heterogeneity and reproductive success at single-cell resolution. *ISME J* 4: 215-222.
- Remus-Emsermann MNP, Tecon R, Kowalchuk GA, Leveau JHJ (2012) Variation in local carrying capacity and the individual fate of bacterial colonizers in the phyllosphere. *ISME J* 6: 756–765.
- Riederer M (2006) Introduction: Biology of the plant cuticle. In: Riederer M, Müller C, editors. *Biology of the Plant Cuticle*, Annual Plant Reviews, Vol. 23. Oxford: Blackwell. pp. 1-10.
- Riederer M, Schreiber L (1995) Waxes: the transport barriers of plant cuticles. In Hamilton RJ (ed) *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. Dundee, UK: The Oily Press. pp. 131-156.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Senín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1222-1230.
- Rigonato J, Alvarenga DO, Anreote FD, Dias ACF, Melo IS, Kent A, Fiore MF (2012) Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 312-322.
- Roda AL, Oldham NJ, Svatos A, Baldwin IT (2003) Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). *Phytochemistry* 62: 527-536.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyrén P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
- Ryan MP, Pembroke JT, Adley CC (2007) *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. *J Appl Microbiol* 103: 754-764.
- Samanta R, Dutta AK, Sen SP (1986) The utilization of leaf wax by N₂-fixing micro-organisms on the leaf surface. *J Agric Sci Camb* 107: 681-685.
- Sandhu A, Halverson LJ, Beattie GA (2009) Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microb Ecol* 57: 276-285.
- Schlegel TK, Schönherr J, Schreiber L (2005) Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta* 221: 648–665.

- Schneider RW, Grogan RG (1977) Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. *Phytopathology* 67: 898-902.
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt RM (2005) Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol* 166: 589–594.
- Schulz S, Giebler J, Chatzinotas A, Wick LY, Fetzer I, Welzl G, Harms H, Schloter M (2012) Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of alkB harbouring microbes in different soil compartments. *ISME J* 6: 1763-1774.
- Shanker KS, Kanjilal S, Rao BVSK, Kishore KH, Misra S, Prasad RBN (2007) Isolation and antimicrobial evaluation of isomeric hydroxy ketones in leaf cuticular waxes of *Annona squamosa*. *Phytochem Anal* 18: 7–12.
- Shepherd RW, Lindow SE (2009) Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol* 75: 45-53.
- Shepherd T, Griffiths DW (2006) The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol* 171: 469-499.
- Shepherd T, Robertson GW, Griffiths DW, Birch ANE (1997) Effects of environment on the composition of epicuticular wax esters from kale and swede. *Phytochemistry* 46: 83-96.
- Shepherd T, Robertson GW, Griffiths DW, Birch ANE, Duncan G (1995) Effects of environment on the composition of epicuticular wax from kale and swede. *Phytochemistry* 40: 407-417.
- Shin D-H, Kim D-U, Seong C-N, Song H-G, Ka J-O (2012) Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *J Microbiol Biotechnol* 22: 448–456.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12115-12120.
- Steinmüller D, Tevini M (1985) Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. *Planta* 164: 557-564.
- Stockwell VO, Johnson KB, Sugar D, Loper JE (2002) Antibiosis contributes to biological control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* 92: 1202-1209.
- Suda W, Nagasaki A, Shishido M (2009) Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. *Microbes Environ* 24: 217-223.
- Sundin GW, Jacobs JL (1999) Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol* 38: 27-38.
- Telias A, White JR, Pahl DM, Ottesen AR, Walsh CS (2011) Bacterial community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *BMC Microbiol* 11: 81.
- Teplitski M, Warriner K, Bartz J, Schneider KR (2011) Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends Microbiol* 19: 121-127.

- Tian D, Tooker J, Pfeiffer M, Chung SH, Felton GW (2012) Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to *woolly* and *hairless* trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* 236: 1053-1066.
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A, Vangronsveld J (2012) Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* Doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00711.x *in press*.
- Tsuba M, Katagiri C, Takeuchi Y, Takada Y, Yamaoka N (2002) Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 60: 51–7.
- Upper CD, Hirano SS (2002) Revisiting the roles of immigration and growth in the development of populations of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. In: Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ, (eds) *Phyllosphere Microbiology*. St. Paul: APS Press. pp. 69-80.
- Valkama E, Koricheva J, Salminen J-P, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Pihlaja K (2005) Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi? *Trees* 19: 191-197.
- Van Beilen JB, Funhoff EG (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 13-21.
- Vogel C, Innerebner G, Zingg J, Guder J, Vorholt JA (2012) Forward genetic *in planta* screen for identification of plant-protective traits of *Sphingomonas* sp. strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Appl Environ Microbiol* 78: 5529-5535.
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA, Riederer M (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *J Exp Bot* 55: 1401–1410.
- Voisin D, Nawrath C, Kurdyukov S, Franke RB, Reina-Pinto JJ, Efremova N, Will I, Schreiber L, Yephremov (2009) Dissection of the complex phenotype in cuticular mutants of *Arabidopsis* reveals a role of SERRATE as a mediator. *PLoS Genet* 5: e1000703.
- Vokou D, Vareli K, Zarali E, Karamanoli K, Constantinidou H-IA, Monokrousos N, Halley JM, Sainis I (2012) Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllosphere and its relationship with airborne bacteria. *Microb Ecol* 64: 714-724.
- Vorholt JA (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828-840.
- Wagner GJ (1991) Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiol* 96: 675-679.
- Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Ann Bot* 93: 3-11.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–5267.
- Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W et al. (2012) Package 'gplots'. <http://cran.r-project.org>
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD (2008) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* 105: 1744-1755.
- Williams TR, Moyne A-L, Harris LJ, Marco ML (2013) Season, irrigation, leaf age and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. *PLoS ONE* 8: e68642.

- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE (1999) Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl Environ Microbiol* 65: 1435-1443.
- Wilson M, Lindow SE (1994) Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol* 60: 4468-4477.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- Wright ES, Yilmaz LS, Noguera DR (2012) DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 78: 717-725.
- Xia L, Junying Z, Wenyuan G, Haiyang W (2012) Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Food Chem Toxicol* 50: 3673-3679.
- Yadav RKP, Karamanoli K, Vokou D (2005) Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microb Ecol* 50: 185-196.
- Yang C-H, Crowley DE, Borneman J, Keen NT (2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3889-3894.
- Yashiro E, Spear RN, McManus PS (2011) Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J Appl Microbiol* 110: 1284-1296.
- Yousaf S, Andria V, Reichenauer TG, Smalla K, Sessitsch A (2010) Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *J Hazard Mater* 184: 523-532.
- Yu X, Lund SP, Scott RA, Greenwald JW, Records AH, Nettleton D, Lindow SE, Gross DC, Beattie GA (2013) Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E425-434.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E (2010) Diversity and activity of PAH-degrading bacteria in the phyllosphere of ornamental plants. *Microb Ecol* 59: 357-368.
- Zhang B, Bai Z, Hoefel D, Tang L, Wang X, Li B, Li Z, Zhuang G (2009) The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Sci Total Environ* 407: 1915-1922.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O _{dest.}	vollentsalztes Wasser
H ₂ O _{dest, ster}	vollentsalztes, steril filtriertes, autoklaviertes Wasser
techn.	technisch
ml	Milliliter, Volumen
µl	Mikroliter, Volumen
L	Liter, Volumen
g	Gramm, Masse
mg	Milligramm, Masse
µg	Mikrogramm, Masse
M	Molar = Mol pro Liter
mM	Millimolar = Millimol pro Liter
µM	Mikromolar = Mikromol pro Liter
m	Meter, Länge
cm	Centimeter, Länge
mm	Millimeter, Länge
min	Minute/n, Zeit
sec	Sekunde/n, Zeit
h	Stunde/n, Zeit
°C	Grad Celsius, Temperatur
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (äquimolare Mischung aus Desoxyadenosinriphosphat, Desoxythymidinriphosphat, Desoxycytidinriphosphat, Desoxyguanosinriphosphat)
bp	Basenpaare
A,T,C,G	DNA-Basen Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin
N	Nicht identifizierte Base
M	DNA-Basen A oder C
Y	DNA-Basen C oder T
U	„unit“, funktionelle Mengeneinheit für Enzyme
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung
EMBL-	„European Molecular Biology Laboratory“
DDBJ-	„DNA DataBank of Japan“
PDB-	„Protein Data Bank“
RefSeq	„Reference Sequence“-Sammlung
GenBank	National Institutes of Health Gensequenzdatenbank
Col-0	Columbia-0 (<i>A. thaliana</i> Ökotyp)
Ler	Landsberg <i>erecta</i> (<i>A. thaliana</i> Ökotyp)
<i>gl1</i>	<i>glabrous1</i> Mutante
<i>cer1, cer6, cer9, cer16</i>	<i>eceriferum</i> Mutanten

UK	United Kingdom
USA	United States of America
z.B.	zum Beispiel
ca.	circa
et al.	et ali(i,ae)
bzw.	beziehungsweise
s.	siehe
s.o.	siehe oben
AG	Arbeitsgruppe
PE	Polyethylen-Kunststoff
Chemische Verbindungen	Siehe Tab.B

7.2 Organismen, Chemikalien, Materialien, Geräte, Kits, Standardprotokolle

7.2.1 Tabellen verwendeter Organismen, Chemikalien, Materialien, Geräte, Kits

Tabelle A: Verwendete Organismen

Organismus	Typ	Stadium	Bezugsquelle
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0 (Col-0) Wildtyp	Samen	PD Dr. Susanne Berger, Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>glabrous1 (gl1)</i> Mutante	Samen	PD Dr. Susanne Berger, Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Landsberg <i>erecta</i> (Ler) Wildtyp	Samen	Elfriede Reisberg, Lehrstuhl für Botanik I, Universität Würzburg
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>eceriferum1 (cer1)</i> Mutante	Samen	European Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham, UK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>eceriferum6 (cer6)</i> Mutante	Samen	European Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham, UK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>eceriferum9 (cer9)</i> Mutante	Samen	European Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham, UK
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>eceriferum16 (cer16)</i> Mutante	Samen	European Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham, UK
Bakterielle Umweltisolate	Siehe 5.5	lebende Zellen	isoliert in dieser Arbeit
<i>Escherichia coli</i>	NovaBlue	lebende Zellen	Christine Gernert, Lehrstuhl für Botanik II, Universität Würzburg

Tabelle B: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	AppliChem, Darmstadt
5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamidlösung 4K 40%, 37,5:1	AppliChem, Darmstadt
Agar Agar, Bacto™ Agar	Carl Roth, Karlsruhe Difco Laboratories Inc, Detroit, USA
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Albumin (aus bovinem Serum)	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydrogenphosphat (NH ₄ H ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Argon (Ar)	Tyczka GmbH & Co KG, Würzburg
BacilloI® plus	Bode Chemie, Hamburg
Bis-N,O-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)	Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich
C ₁₆ -Alkan (Hexadecan, C ₁₆ H ₃₄)	Sigma-Aldrich
C ₂₂ -Alkan (Docosan, C ₂₂ H ₄₆)	Sigma-Aldrich
C ₂₄ -Alkan (Tetracosan, C ₂₄ H ₅₀)	Sigma-Aldrich
Cacodylat 0,2mM, pH7,2	Carl Roth, Karlsruhe
Citifluor	Citifluor Ltd., Leicester
Cobaltchlorid Hexahydrat 98% (CoCl ₂ x 6 H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem, Darmstadt
dNTPs, einzeln zum Mischen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Fortsetzung Tab. B:

Chemikalie	Hersteller
Eisensulfat ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 70%, ~100%) (Verdünnungen 30%, 50%, 90% mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$)	Carl Roth, Karlsruhe AppliChem
Ethanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 100%) (70% Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest, ster}}$)	AppliChem, Darmstadt
Ethidumbromidlösung 1%	AppliChem, Darmstadt
Ethylidiaminessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Flüssiges Kohlendioxid (CO_2)	Tyczka GmbH & Co KG, Würzburg
Formaldehyd-Lösung 37%	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Helium (He)	Air Liquide
Immersionsöl Immersol™ 518F	Carl Zeiss Gruppe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumsulfat (K_2SO_4)	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe
Manganchlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MS+MES #M0254	Duchefa Biochemie, Haarlem
Natriumammoniumhydrogenphosphat Tetrahydrat ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Ferak, Berlin
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhypochlorid (NaOCl) 12% Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat Dihydrat 99,5% ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Pyridin 99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
Roti® Mount FluorCare DAPI	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
Silwet® L-77	Momentive
Stärke, löslich	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoffgas (N_2)	Air Liquide
Temed	AppliChem, Darmstadt
Trichlormethan (Chloroform, CHCl_3)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoff (H_2)	Wasserstoffgenerator (s. Tab. D)
Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle C: Verwendete Materialien

Material	Hersteller, Bezugsquelle
Anzuchtschalen, Piki-Saat 80, ohne Siebboden, 20 x 30 x 4,5 cm, braun	Wiesaplant, Wiesau
Deckgläschen 18x18mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig
Dichtscheiben G-12, NK/TFE	Altmann-Analysentechnik-Vertriebs-GmbH, Holzkirchen
Drigalskispatel	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
EasyLoad® Pipettenspitzen 1ml (blau), 200µl (gelb)	greiner bio-one, Frickenhasuen
Einheitserde P Zusammensetzung: Naturton, Weißtuff, pH 5,8	Patzer, Sinnatal-Jossa
Einmalspritzen 50ml mit Luer-Lock, steril	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Elektronenmikroskopietischchen 0,5", Aluminium	Agar Scientific Limited, Essex
Gaschromatographiesäule DB1-HT (30m Länge, 0.32mm Innendurchmesser, 0.1µm Schichtdicke)	Agilent Technologies
Gaschromatographiesäule ZB1, Zebtron™ (30m Länge, 0.32mm Innendurchmesser, 0.1µm Schichtdicke)	Phenomenex, Aschaffenburg
Glasgefäße 20ml + Deckel mit PTFE Septen	Altmann-Analysentechnik-Vertriebs-GmbH, Holzkirchen
Glasinserts 15mm Spitze, f. weite Öffnung, 0,2ml/6x31mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Glasreagenzgläser 10ml 160x15/16mm	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Glasreaktionsgefäße 1ml REACTI-VIAL 1,0ml, klar	Thermo Scientific Inc.
Glasvials 1,5ml N9, flach, 11,6x32mm, klar	Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Hamiltonspritzen (10µl, 50µl, 1000µl)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz
Handschuhe Latex	Caromed GmbH, Leipzig
Handschuhe Nitril	Ansell
Kanülen Sterican 0,7x30mm 22Gx11/4"	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kunststoffgefäße 50ml, 15ml CELLSTAR®	greiner bio-one, Frickenhausen
Kunststoffgefäße 2ml, 1,5ml, 0,5ml	greiner bio-one, Frickenhausen Eppendorf, Hamburg
Kunststofftöpfe 7,5 cm, rund, TO 7,5 Farbe „ton“	Pöppelmann GmbH & Co KG, Lohne
Mainsand, gewaschen	Lenz-Ziegler-Reifenscheid GmbH, Würzburg
Objektträger 76x26mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG „Assistent“, Sondheim
PCR-Strips 0,2ml, 8er/12er mit gewölbtem Deckel	Brand GmbH & Co KG, Wertheim Thermo Scientific Inc.
PE-Becher klar, geriffelt 108x82x86mm + PVC-Deckel klar, 108x82mm	Wächter & Co. GmbH, Leopoldshöhe
Petrischalen 94x16mm	greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl (weiß), OMNITIP™ FastRack	ULPlast Sp. zo. o., Warschau
Pipettenspitzen gestopft 1ml, 200µl, 10µl, 2,5µl	Biozym
Polykarbonatfilter 0,2µm, schwarz und weiß	Millipore, Billerica, MA, USA
Rundfilter 90mm	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Schraubkappen, blau, Loch, Red Rubber/FEP 1,0mm	Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher&Schüll BioScience, Dassel
Tesafilm	Tesa SE, Hamburg
Vermiculite	Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhövel

Tabelle D: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec 3150 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH, Wettenberg
AxioCam MRm	Carl Zeiss Gruppe
Critical Point Dryer 030	BAL-TEC AG, Balzers
DAPI-Filter Filtersatz 49	Carl Zeiss Gruppe
DAPI-Filter Filterwürfel D	Leica Microsystems
DGGE-Gerät DCode™	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Elektrophoresis Power Supply Consort E844	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Experion™ System für die Mikrogelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Field-Emission Rasterelektronenmikroskop JSM 7500F	Jeol Ltd., Tokio
Fotokamera IXUS 801S	Canon
Gaschromatograph mit Massenspektrometer 6890N & MSD 5973, m/z 50-750	Agilent Technologies
Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor 5890 Hewlett Packard Series II	Agilent Technologies
Gefriertruhe -80°C „Ultra Low Temperature Freezer“	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Gel Doc XR	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Gelelektrophoresekammern Modell 40-0911 + Zubehör	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glasapparatur zum Filtern	Sigma-Aldrich
Gradientenpumpen Modell 475	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Heizblock HBT 130	HLC-Haep Labor Consult, Bovenden
INCU-Line Brutschrank	VWR International
Klimaschrank, Percival Intellus environmental controller Modell I-66LQ4	CLF Laborgeräte, Emersacker
Kühl-Gefrierschrank 4°C/-20°C glass line	Liebherr
Leica DMR Mikroskop	Leica Microsystems
Leica MZ 16 Binokular	Leica Microsystems
Magnetrührer „Hotplate Stirrer“ Model L-81	Labinco B.V., Breda
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
Okular mit Zählgitter PI 10x /23	Carl Zeiss Gruppe
Ölimmersionsobjektiv HCX PL Fluotar 1,30-0,60 OIL	Carl Zeiss Gruppe
Ölimmersionsobjektiv Plan-Apochromat 1,40 OIL DIC	Carl Zeiss Gruppe
PCR-Gerät, biometra T3000, Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
PCR-Gerät, Mastercycler <i>gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
Photometer NanoDrop 1200	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten „eppendorf research“ 0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Rasterelektronenmikroskop DSM 962	Carl Zeiss Gruppe
Scanner hp scanjet 7400c	Hewlett-Packard
Schüttler KS 15	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Schüttler SM-30 mit Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Sequenzierer ABI 377 XL	Perkin Elmer
Sputtergerät SCD 005	BAL-TEC AG, Balzers
Sterilbank NU-440-400E Series 3	NUAIRE, Plymouth
Trockenschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Trockenschrank RT D06062 Modell 600	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad, Sonorex super RK 514 BH	Bandelin Electronics, Berlin
Vakuumhandpumpe Nalgene®	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortex-GENIE® 2	Scientific Industries Inc, New York City, USA
Waage Mettler PM480 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Wasserstoffgenerator "Hydrogen Generator NMH ₂ 500"	Schmidlin Labor&Service GmbH, Schwäbisch Gmünd

Fortsetzung Tab. D:

Gerät	Hersteller
Zeiss Axiophot Mikroskop	Carl Zeiss Gruppe
Zeiss Observer.Z1 Mikroskop	Carl Zeiss Gruppe
Zentrifuge 5415R (mit Kühlaggregat)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco 17 (mit Kühlaggregat)	Thermo Scientific Inc.
Zentrifuge Rotina 48R (für 15/50ml Rörchen)	Hettich, Tuttlingen

Tabelle E: verwendete Kits, Enzyme und DNA-Marker

Name	Anwendung	Hersteller
ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzier PCR Reaktionen	Life Technologies Corporation
CloneJet PCR Cloning Kit pJET1.2/blunt	PCR Produkt Klonierung	Thermo Scientific Inc.
DGGE Marker II	DGGE Marker, 10 Fragmente	Wako Chemicals GmbH, Neuss
DreamTaq DNA Polymerase	PCR Reaktionen	Thermo Scientific Inc.
Experion™ DNA 1K Analysis Kit	Mikrofluid-Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Fast Digest® Restriktionsenzyme MspI, HaeII	RFLP-Analyse	Thermo Scientific Inc.
FastDNA® Kit	DNA Isolierung	MP Biomedicals, LLC
FastDNA® Spin for Soil Kit	DNA Isolierung	MP Biomedicals, LLC
Genecraft® SupraTherm™ Taq DNA Polymerase	PCR Reaktionen	Ares Bioscience GmbH, Köln
innuPREP Bacteria DNA Kit	DNA Isolierung	Analytik Jena AG, Jena
KAPA2G™ Robust PCR-Kit	PCR Reaktionen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
KAPAHiFi™ PCR Kit	“High fidelity” PCR Reaktionen	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Lysozym	DNA Isolierung	Carl Roth, Karlsruhe
MasterPure™ Complete	DNA Isolierung	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA
NucleoSpin® Gel&PCR Cleanup	PCR Aufreinigung	Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren
peqGOLD 100bp DNA-Leiter Plus (100-3000bp)	DNA Marker für Agarosegele	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PeqGOLD Gel Extraction Kit	PCR Aufreinigung	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PeqGOLD MicroSpin Cycle-Pure Kit	PCR Aufreinigung	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Plasmidpräparation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM-T® Easy Vector System I	PCR Produkt Klonierung	Promega Corporation
Proteinase K	DNA Isolierung	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA
QuickExtract™ DNA Extraction Solution	DNA Isolierung	Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA

Tabelle F: verwendete Software

Bezeichnung des Programms	Hersteller/Referenz	Bezugsquelle/Lizenznehmer
Adobe Illustrator	Adobe Systems Incorporated	Universität Würzburg
Adobe Photoshop	Adobe Systems Incorporated	Universität Würzburg
ARB©	Ludwig et al. 2004	AG Hentschel, Lehrstuhl für BotanikII
AxioVision Software Release 4.8.1	Carl Zeiss Gruppe	Lehrstuhl für BotanikII
BLAST®	Altschul et al. 1990	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Cytoscape v2.8.2	Cytoscape Consortium 2001-2013	http://www.cytoscape.org/
FigTree v1.3.1	Andrew Rambaut, 2006-2009	http://tree.bio.ed.ac.uk/
GC ChemStation Rev.A.10.02[1757]	Agilent Technologies	AG Riederer, Lehrstuhl für BotanikII
KiNG version 2.20	Ian W. Davis, Vincent B. Chen, Daniel A. Keedy 2002-2011	http://kinemage.biochem.duke.edu
Leica IM	Leica Microsystems	Lehrstuhl für BotanikII
MS Office 2007/ 2010	Microsoft Corporation	Universität Würzburg
MSD ChemStation D.02.00.275	Agilent Technologies	AG Riederer, Lehrstuhl für BotanikII
PAST	Hammer et al. 2001	http://folk.uio.no/ohammer/past/
QIIME v 1.4	Caporaso et al. 2010b	http://qiime.org/index.html
Quantity One® 1-D Analysis	Bio-Rad Laboratories, Inc.	AG Hentschel, Lehrstuhl für BotanikII
R	R Development Core Team 2008	http://www.r-project.org/
R Paket ‚gplots‘ v 2.11.0	Warnes et al. 2012	http://www.r-project.org/
R Paket ‚vegan‘ v2.0-5	Oksanen et al. 2012	http://www.r-project.org/
STATISTICA	StatSoft (Europe) GmbH, Hamburg	Universität Würzburg
Vector NTI	Life Technologies Corporation	AG Hentschel, Lehrstuhl für BotanikII

7.2.2 Protokoll zur Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Saatgut

Samen in sterilen Reaktionsgefäßen 20 min in 2 ml ~100% Ethanol (techn.) schütteln lassen oder invertieren.

Das Ethanol abnehmen und gegen 1ml 6% Natriumhypochlorid/TritonX-100 Lösung austauschen. Samen für weitere 10 min schütteln.

Unter der Sterilbank 1ml steriles Leitungswasser/H₂O_{dest, ster} (1:1) zugeben und nach Absetzen der Samen die gesamte Flüssigkeit soweit wie möglich entfernen.

Samen durch wiederholtes Zugeben und Abnehmen 1 ml sterilen Wassers spülen, bis der Überstand keine Trübung mehr aufweist.

Die Samen daraufhin sofort mit einer Pipette aussäen oder zunächst auf Filterpapier unter der Sterilbank trocknen, in sterile 1,5ml Reaktionsgefäße portionieren und bei 4 °C bis zur Aussaat lagern.

7.2.3 Protokoll zur Isolierung von genomischer DNA von Bakterien

500µl Flüssigkultur bei 4°C und 8000rpm für 10min zentrifugieren, Überstand verwerfen.

1ml TNE-Lösung zupipettieren und 5min bei 8000rpm zentrifugieren.

Überstand verwerfen und Pellet in 270µl TNEX-Lösung resuspendieren.

25µl Lysozym (10mg/ml) zugeben und bei 37°C 30min inkubieren.

50µl ProteinaseK (20mg/ml) zugeben und 1,5h bei 55°C inkubieren.

15µl 5M NaCl und 500µl 100% eiskaltes Ethanol zugeben und 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugieren.

Überstand entfernen und das Pellet in 70% Ethanol waschen, nochmal 5min bei 13000rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet lufttrocknen lassen.

Pellet in 60µl H₂O_{dest} aufnehmen.

7.3 Lösungen und Medien

Tabelle G: Verwendete Lösungen. Abkürzungen siehe Tab. B

Lösungs-Bezeichnung	Zusammensetzung
Acrylamidlösung 0% denaturierend für die DGGE (10% Acrylamid)	Je 100ml: 25ml 40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung 37,5:1 2ml 50xTAE 73ml H ₂ O _{dest}
Acrylamidlösung 80% denaturierend für die DGGE (10% Acrylamid)	Je 100ml: 25ml 40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung 37,5:1 2ml 50xTAE 35ml H ₂ O _{dest} 40ml Formamid 42g Harnstoff
EDTA-Lösung 0,5M pH8	Je 1L: 186,1g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ca. 20g NaOH Plätzchen (pH-Wert-Einstellung) ad 1000ml H ₂ O _{dest}
Eisenstammlösung	Je 500ml: 0,7g FeSO ₄ x 7H ₂ O 0,95g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 500ml H ₂ O _{dest}
Gelladepuffer für Agarosegele	0,025% Bromphenolblau 40% Saccharose
Gelladepuffer für die DGGE	0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylencyanol 30% Glycerin
Kaliumphosphatpuffer 0,1M pH 7	61,5ml/L 1M K ₂ HPO ₄ 38,5ml/L 1M KH ₂ PO ₄
Karnovsky-Fixierlösung	Je 20ml: 10ml 4% Formaldehydlösung (1g Paraformaldehyd in 0,2M Cacodylatlösung pH7,2) 2ml Glutaraldehyd 25% 8ml H ₂ O _{dest}
Mg ²⁺ -Lösung (2M)	1M MgCl ₂ x 6H ₂ O 1M MgSO ₄ x 7H ₂ O
Natriumhypochlorid/TritonX-100	6% NaOCl in H ₂ O 3 Tropfen TritonX-100 je 40ml NaOCl-Lösung
Sörensenpuffer 50mM pH7,4	Je 50ml: 3,125ml Glutaraldehyd 25% 25 ml Sörensen-Phosphatpuffer (je 100ml, pH7,4: 12,2ml 100mM KH ₂ PO ₄ 81,8ml 100mM Na ₂ HPO ₄) Ad 50ml H ₂ O _{dest}
Spurenmineralienlösung	2,86g/L H ₃ BO ₃ 1,81g/L MnCl ₂ 25mg/L Na ₂ MoO ₄ 0,22g/L ZnSO ₄ x 7H ₂ O 0,08g/L CuSO ₄ x 5H ₂ O 0,06g/L CoCl ₂ x 6 H ₂ O
TAE (50x)	je 1Liter: 242g Tris ultrapure 57,1ml Essigsäure 100% 100ml 0,5M EDTA-Lösung pH8

Fortsetzung Tab. G:

Lösungs-Bezeichnung	Zusammensetzung
TNE-Lösung	Je 100ml: 1ml Tris 1M pH8 0,2ml NaCl 5M 2ml EDTA-Lösung ad 100ml H ₂ O _{dest}
TNEX-Lösung	Je 100ml: 1ml TritonX-100 ad 100ml TNE-Lösung

Tabelle H: Zusammensetzung der für die Bakterienkultivierung verwendeten Medien. Abkürzungen der Chemikalien: siehe Tab. B. Die Medien wurden zur Verwendung als Kultivierungsplatten durch Zugabe von 2% Agar verfestigt.

Inhaltsstoffe	Medium										
	SOC	AIX	LB/ Amp	LB	0,1x LB	KB	M1	MSM 1	MSM 2	MSM 3	MSM 4
Trypton/Pepton	20g	10g	10g	10g	1g	20g	2g				
Hefeextrakt	5g	5g	5g	5g	0,5g		4g				
NaCl	0,6g	10g	10g	10g	1g					0,5g	0,5g
K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O						2,25g				2,5g	2,5g
Glycerin						10g					
Stärke							10g				
NaNH ₄ HPO ₄ x 4H ₂ O								1,74g	1,74g		
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O								0,54g	0,54g		
KCl	0,2g							0,04g	0,04g		
MgSO ₄ x 7H ₂ O								0,2g	0,2g	0,5g	0,5g
FeSO ₄ x 7H ₂ O								5mg	5mg		
NH ₄ H ₂ PO ₄										5g	5g
K ₂ SO ₄										0,46g	0,46g
Spurenmineralien- lösung ¹								1ml	1ml	1ml	1ml
Mg ²⁺ -Lösung ¹	10ml										
Methanol								5ml			
Glucose	3,6g								5g		
C ₁₆ -Alkan										1-10g	
C ₂₂ -Alkan											1g
Ampicillin (100mg/ml)		1ml	1ml								
IPTG (1M)		500µl									
X-Gal (5%)		1,6ml									
Cycloheximid (100mg/ml)				1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
H ₂ O ad	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L
Medium	Referenz										
SOC	http://de.wikipedia.org/wiki/SOB-Medium										
AIX, LB LB/Amp, 0,1x LB	Standardmedien AG Hentschel LB plus Ampicillin, LB 1:10 verdünnt										
KB	KB (persönliche Mitteilung Thomas Griebel) 1:10 verdünnt										
M1	Abwandlung des in Mincer et al. 2005 beschriebenen Mediums, es wurde H ₂ O _{dest} statt Seewasser verwendet.										
MSM 1 MSM 2	ATCC 508, http://www.lgcstandards-atcc.org/ ATCC 508 mit Glucose statt Methanol										
MSM 3 & 4	Abwandlungen des in Nhi-Cong et al. 2010 beschriebenen Mineralmediums, es wurde hier die Spurenelementlösung wie in ATCC 508 verwendet.										

1: Lösungszusammensetzung siehe Tab. G

Tab. I: Für die sterile Pflanzenanzucht verwendete Medien.

Medium	Inhaltsstoffe				
	MS+MES (s. Tab. B)	Saccharose	Eisenstammlösung (s. Tab. G)	pH	Agar-Agar
PM1	0,5x	-	-	5,7/KOH	1,5%
PM2	1x	20g/L	20ml/L	5,7/KOH	1%

7.4 Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane 1991
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane 1991
341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al. 1998
907r	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT	Muyzer et al. 1998
GCclamp	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCGCGCCCCGCCCC	Muyzer et al. 1998
Sp6 (pGEM-T® Easy)	GATTTAGGTGACACTATAGAATA	Promega Corporation
T7 (pGEM-T® Easy)	GAATTGTAATACGACTCACTATAG	Promega Corporation
pJET1.2Forward (CloneJet)	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Thermo Scientific Inc.
pJET1.2Reverse (CloneJet)	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Thermo Scientific Inc.
A_Ler_1_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_Ler_2_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACAGTCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_Ler_3_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer1_1_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATGCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer1_2_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer1_3_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer6_1_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTATCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer6_2_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTCGCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer6_3_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTGACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer9_1_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGTACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer9_2_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGAGACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer9_3_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCAGCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer16_1_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCGTCCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer16_2_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
A_cer16_3_341f	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTACCCTACGGGAGGCAGCAG	diese Arbeit
B_907r	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCCGTCAATTCMTTGGAGTTT	diese Arbeit

7.5 T-Tests zur Wachsanalyse der *cer*-Mutanten (Abb. 13/14/15)

Tabelle K: p-Werte der in den Abbildungen 13, 14 und 15 angeführten statistischen Auswertung mittels Student's T-Test. Es wurden jeweils die in den Wildtypextrakten gemessenen Mengen mit den Mengen in den Extrakten der einzelnen *cer*-Mutanten verglichen. Abkürzungen: ane = Alkane, ale = Aldehyde, srn = Fettsäuren, esr = Ester, ole = Alkohole, ak = andere Komponenten, ni = nicht identifizierte Substanzen, an = Alkan, fs = Fettsäure, al = Aldehyd, es = Ester, ol = Alkohol.

	<i>cer1</i>	<i>cer6</i>	<i>cer9</i>	<i>cer16</i>
ane	0,000117	0,000763	0,000001	0,000938
ale	0,002726	0,003065	0,000404	0,028292
srn	0,295493	0,002641	0,002996	0,108359
esr	0,000629	0,096526	0,026985	0,000361
ole	0,267579	0,952012	0,000014	0,085026
ak	0,303317	0,161324	0,005764	0,221746
ni	0,018519	0,278980	0,000753	0,820079
23an	0,458633	0,049242	0,023916	0,713859
25an	0,013835	0,009620	0,009313	0,018363
26an	0,010728	0,017562	0,000083	0,006228
27an	0,000066	0,033020	0,505431	0,650288
28an	0,040558	0,359189	0,002308	0,428780
29an	0,000192	0,019408	0,000002	0,025629
30an	0,007367	0,157089	0,001128	0,335346
31an	0,000159	0,000408	0,000003	0,000565
32an	0,000395	0,003828	0,000065	0,007887
33an	0,000068	0,000022	0,000001	0,000649
16fs	0,087634	0,836298	0,067723	0,110097
18fs	0,046265	0,601922	0,012439	0,186391
20fs	0,483845	0,846543	0,007731	0,920000
22fs	0,352914	0,046099	0,023699	0,418202
23fs	0,323822	0,079332	0,000020	0,260019
i24fs			0,000638	
24fs	0,365745	0,053192	0,000012	0,445377
25fs	0,020645	0,042272	0,000039	0,324892
i26fs			0,000016	
26fs	0,030336	0,098548	0,000000	0,063832
27fs	0,119814	0,054053	0,000038	0,000476
28fs	0,024034	0,216907	0,000277	0,045147
29fs	0,171386	0,105717	0,120027	0,261167
i30fs	0,656048	0,909434	0,000499	0,000002
30fs	0,223197	0,015530	0,005166	0,127982
31fs	0,495387	0,008689	0,001892	0,125566
i32fs	0,530234	0,041248	0,000057	0,000057
32fs	0,917767	0,002290	0,000405	0,126532
33fs	0,764954	0,001169	0,000139	0,330995
34fs	0,158582	0,000105	0,000024	0,150088
35fs	0,316549	0,023776	0,016832	0,841785
36fs	0,946258	0,033705	0,081722	0,536086
28al	0,035066	0,061380	0,013075	0,690998
30al				0,001973
32al	0,472590	0,297743	0,009739	0,008436

34al	0,054472	0,019471	0,019471	0,894153
36es				0,039480
38es	0,456123	0,418606	0,000088	0,559587
40es	0,765274	0,294854	0,000344	0,713985
42es	0,007847	0,607151	0,000458	0,005581
43es	0,023514	0,187247	0,000169	0,215962
i44es	0,002362	0,444680	0,001527	0,002362
44es	0,006979	0,309066	0,002330	0,005595
i45es		0,000789		
45es	0,000234	0,003508	0,030167	0,001514
i46es	0,595823	0,671534	0,000692	0,000054
46es	0,008650	0,351021	0,334699	0,007710
47es	0,000922	0,041682	0,026488	0,001275
i48es	0,006755	0,419562	0,057588	0,000033
48es	0,005505	0,156222	0,057539	0,000890
49es	0,039613	0,017999	0,002136	0,026613
i50es	0,009115	0,032058	0,002996	0,000000
50es	0,000213	0,067920	0,010418	0,001120
i51es	0,004543	0,005217		0,010003
51es	0,000179	0,010980	0,002752	0,012929
i52es	0,038575	0,004567	0,000668	0,000015
52es	0,000382	0,054619	0,023937	0,000655
53es	0,000330	0,013207	0,008684	0,003170
i54es	0,062656	0,006947	0,005210	0,000659
54es	0,000048	0,048458	0,011867	0,002001
55es	0,030366	0,001442	0,004712	0,181033
i56es	0,018539	0,003387	0,506360	0,000771
56es	0,000795	0,025369	0,019884	0,032974
57es		0,001184	0,002256	0,006923
i58es	0,023525	0,640573	0,039681	0,003596
58es	0,777118	0,619225	0,158334	0,953618
22ol	0,966866	0,005294	0,415497	0,434912
23ol	0,001976	0,000404	0,006617	
24ol	0,491596	0,041167	0,387620	0,788836
25ol		0,000100	0,001975	0,373901
26ol	0,080803	0,129761	0,002074	0,284460
27ol		0,001880	0,000407	0,000981
i28ol	0,089975	0,007089	0,792063	0,116256
28ol	0,004729	0,367972	0,000112	0,322098
29ol	0,089933	0,279237	0,028307	0,166699
i30ol	0,007742	0,074674	0,000016	0,000004
30ol	0,939992	0,812020	0,000001	0,022905
i31ol	0,382518	0,120940	0,008803	0,003708
31ol	0,319381	0,013698	0,000001	0,905389
i32ol	0,042836	0,002449	0,000001	0,000000
32ol	0,379519	0,005109	0,000000	0,085490
33ol	0,003740	0,004411	0,000076	0,084769
i34ol	0,011604	0,000413	0,000413	0,000413
34ol	0,027161	0,007482	0,000003	0,911439

7.6 T-Tests zur Gesamtzellquantifizierung (Abschnitt 4.4.1, Abb. 32)

Tabelle L: Statistische Vergleiche der in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Quantifizierungen (je n= 3-4, siehe Abb. 32). Es wurde ein Student's T-Test verwendet. GZ = Gesamtzellzahl, K = Zahl der Kolonien bildenden Einheiten, ns = nicht signifikant. Es ist jeweils die Aussage signifikant/nicht signifikant sowie rechts daneben der zugehörige p-Wert gegeben.

8Wochen - 8+4 Wochen Freiland				
	GZ		K	
Ler	signifikant	0.011024	signifikant	0.001419
cer1	signifikant	0.001068	signifikant	0.005575
cer6	signifikant	0.031404	signifikant	0.004713
cer9	signifikant	0.001932	signifikant	0.000026
cer16	signifikant	0.001695	signifikant	0.026567

8+4 Wochen Freiland - 14 Wochen Klimaschrank				
	GZ		K	
Ler	signifikant	0.009676	signifikant	0.005788
cer1	signifikant	0.006749	signifikant	0.017945
cer6	ns	0.074699	signifikant	0.037233
cer9	ns	0.061661	ns	0.556080
cer16	signifikant	0.007397	ns	0.064494

8 - 14 Wochen Klimaschrank				
	GZ		K	
Ler	ns	0.179891	ns	0.215784
cer1	ns	0.302261	ns	0.703825
cer6	ns	0.113532	ns	0.135227
cer9	ns	0.259017	ns	0.280759
cer16	signifikant	0.006149	ns	0.404298

K - GZ						
	8 Wochen Klimaschrank		8 + 4 Wochen Freiland		14 Wochen Klimaschrank	
Ler	signifikant	0.016022	signifikant	0.016158	ns	0.089631
cer1	signifikant	0.000293	signifikant	0.005556	ns	0.156194
cer6	signifikant	0.007041	ns	0.071664	ns	0.078839
cer9	signifikant	0.001870	signifikant	0.001701	ns	0.207874
cer16	signifikant	0.000201	signifikant	0.008141	signifikant	0.000549

GZ Pflanzenlinien						
	8 Wochen Klimaschrank		8 + 4 Wochen Freiland		14 Wochen Klimaschrank	
Ler - cer1	ns	0.243382	ns	0.616375	ns	0.288750
Ler - cer6	ns	0.389892	ns	0.296590	ns	0.108247
Ler - cer9	ns	0.920052	ns	0.517994	ns	0.210872
Ler - cer16	ns	0.110916	ns	0.571912	ns	0.073777

K Pflanzenlinien						
	8 Wochen Klimaschrank		8 + 4 Wochen Freiland		14 Wochen Klimaschrank	
Ler - cer1	ns	0.306686	ns	0.053447	ns	0.383076
Ler - cer6	ns	0.199521	ns	0.077283	ns	0.205175
Ler - cer9	ns	0.961669	signifikant	0.012794	ns	0.337880
Ler - cer16	ns	0.560448	ns	0.106554	ns	0.307347

7.7 Zusätzliche DGGE-Gelbilder

Zu Abschnitt 4.3.2:

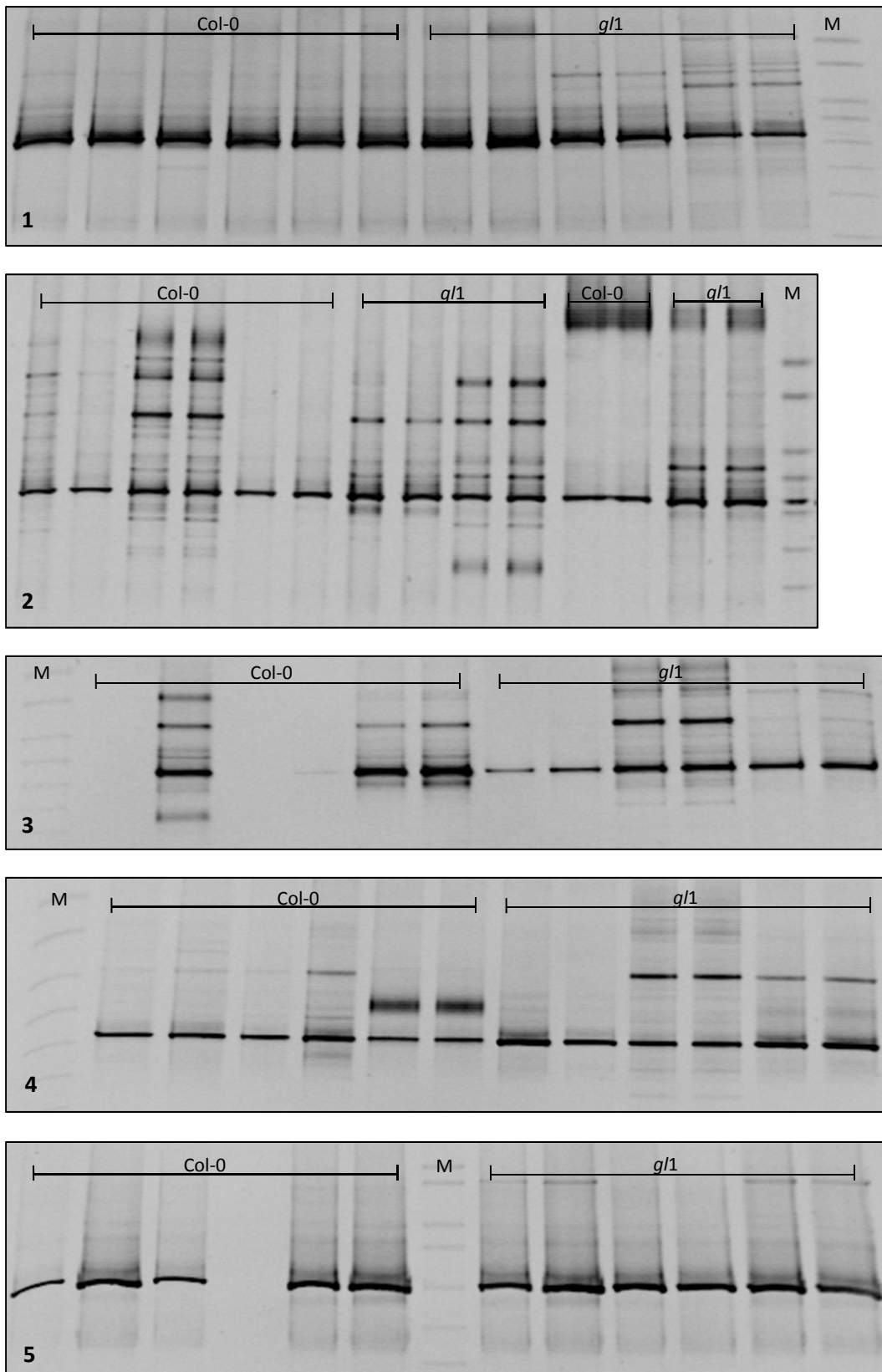


Abb. A: Zusätzliche DGGE-Gelbilder des Vergleichs bakterieller Gemeinschaften auf im Klimaschrank gewachsenen *A. thaliana* Col-0 und *g/1*. Gel 1, 3 und 5 zeigen jeweils voneinander unabhängige biologische Replikate aus eigenen Anzuchtchargen. Auf Gel 2 und 4 sind einzelne Replikate aus mehreren dieser Chargen kombiniert. Jedes biologische Replikat wurde in je zwei technischen Replikaten aufgetragen. M=Marker.

Zu Abschnitt 4.3.3:

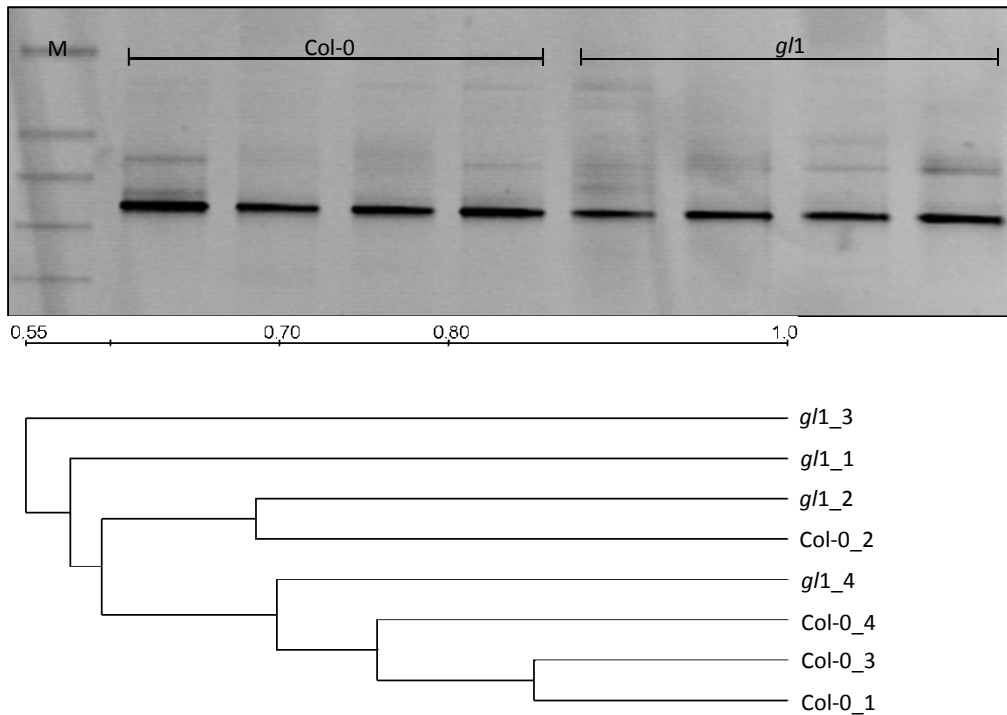


Abb. B: Wiederholte Analyse bakterieller Gemeinschaften von Col-0 und *gl1*-Pflanzen nach einer Freilandwachstumsperiode. Es sind jeweils vier biologische Replikate, die nach einer Freilandwachstumsperiode des Jahres 2011 gewonnen wurden, mit jeweils einem technischen Replikat aufgetragen. M=Marker. Untenstehend ist die mittels QuantityOne® durchgeführte Clusteranalyse für das Gel gezeigt, die Nummerierung der Replikate erfolgte jeweils von links nach rechts.

Zu Abschnitt 4.4.3:

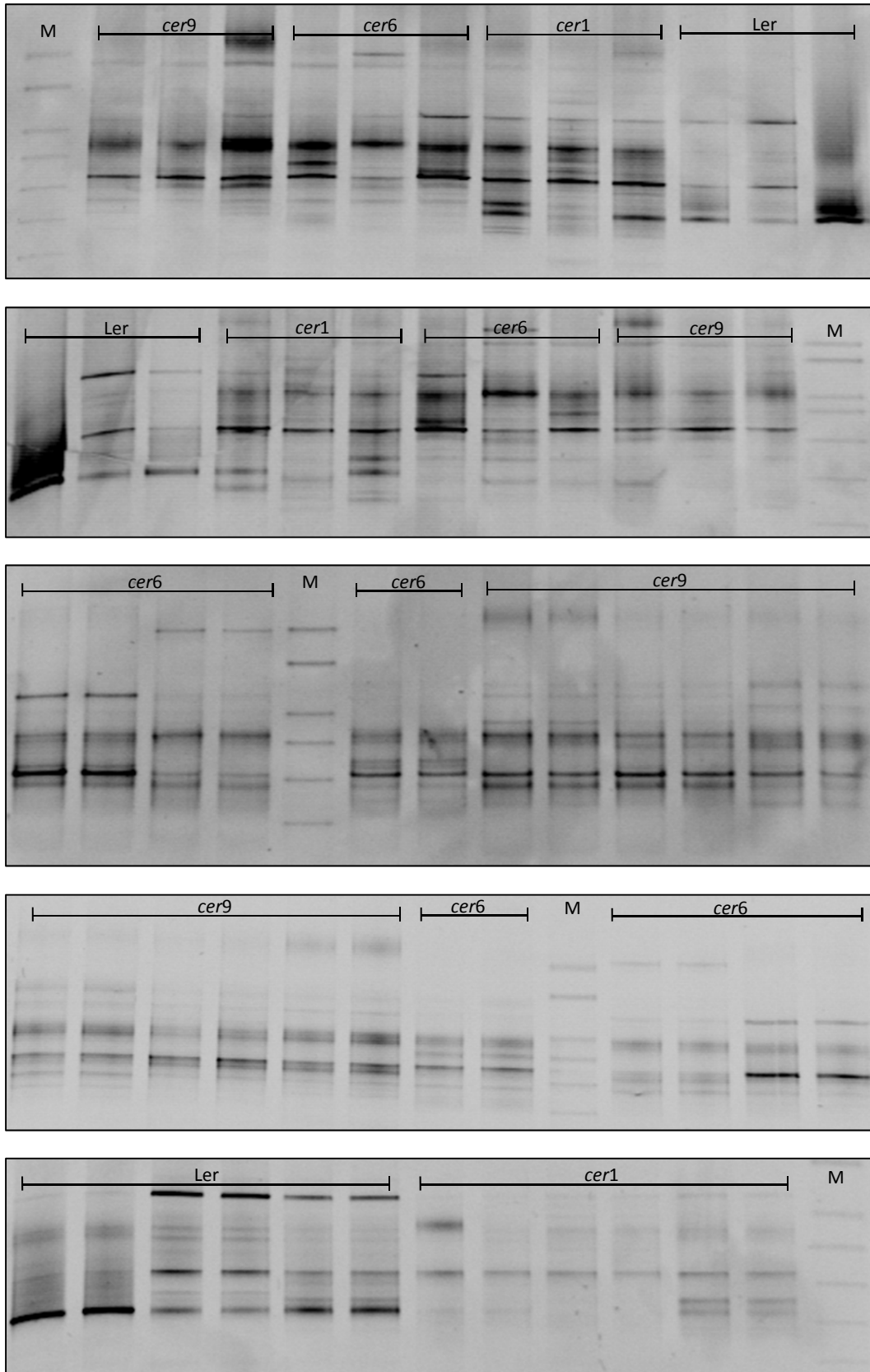


Abb. C: Zusätzliche DGGE-Gelbilder des Vergleichs bakterieller Gemeinschaften auf *A. thaliana* Ler und drei *cer*-Mutanten (*cer1*, *cer6*, *cer9*) nach der Freilandwachstumsperiode des Jahres 2010 (Vgl. Abb. 34). Alle gezeigten Replikate entsprechen einander, d.h. es sind drei Replikate jeder Pflanzenlinie auf mehreren Gelen aufgetragen. Jedes biologische Replikate wurde in je zwei technischen Replikaten aufgetragen. M=Marker.

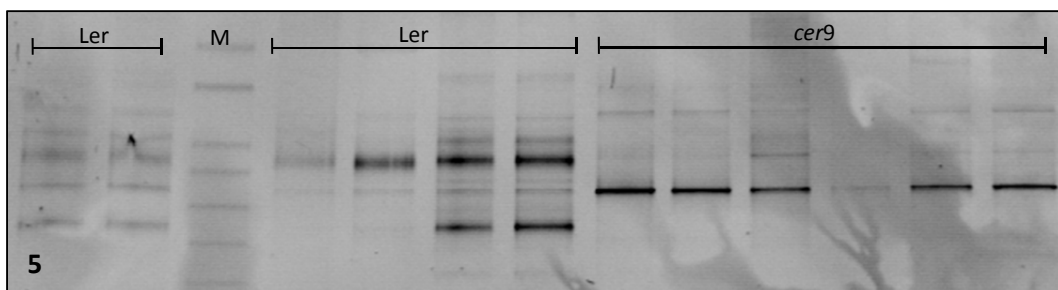
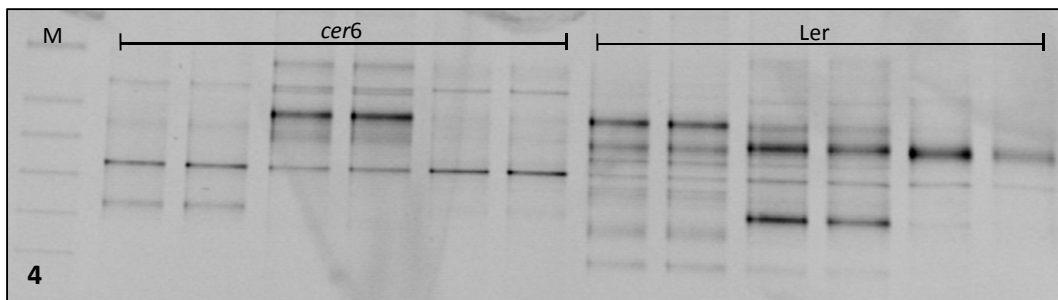
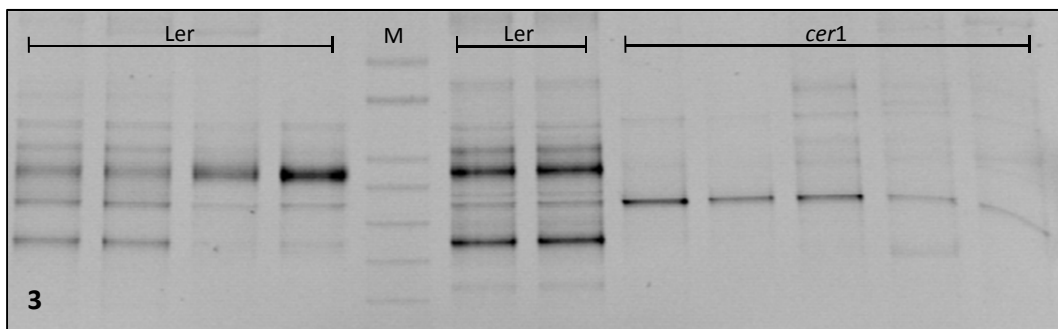
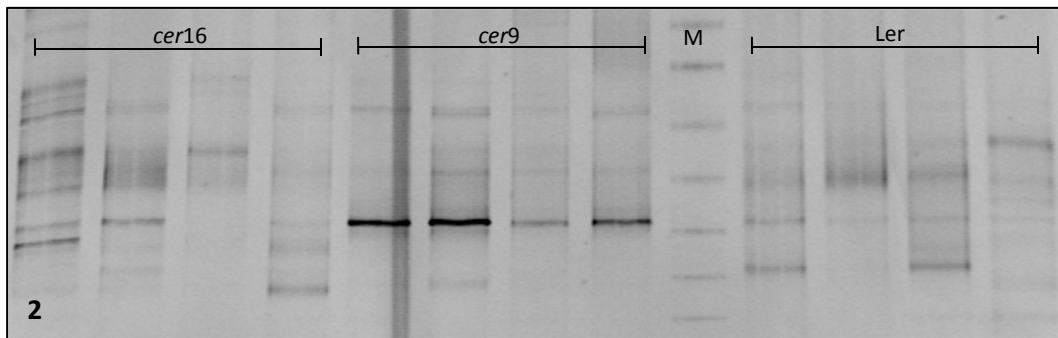
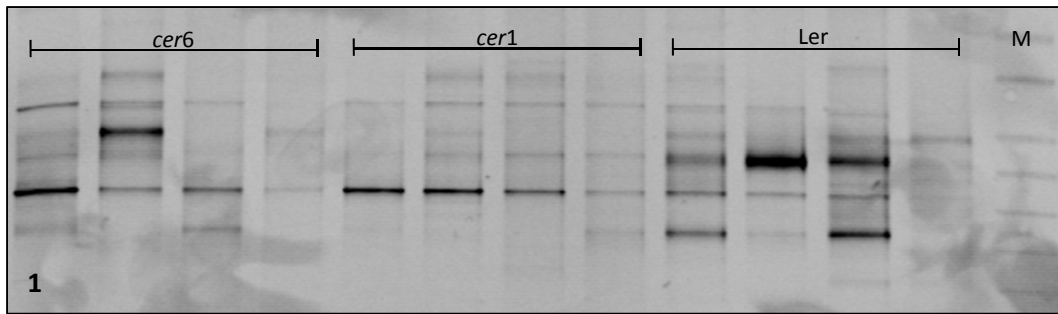


Abb. D – Fortsetzung nächste Seite

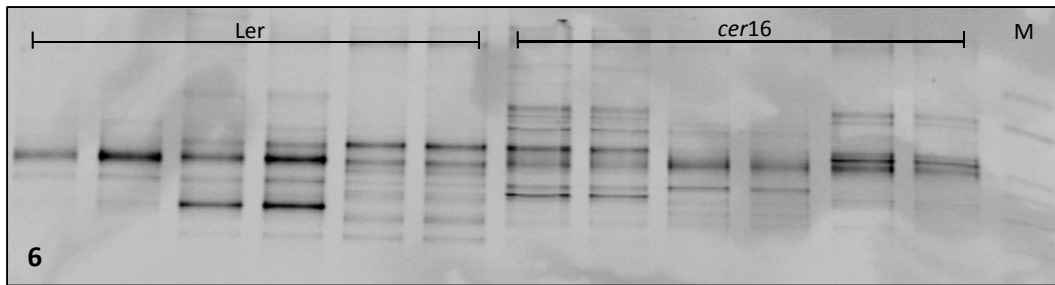


Abb. D: Zusätzliche DGGE-Gelbilder des Vergleichs bakterieller Gemeinschaften auf *A. thaliana* Ler und vier *cer*-Mutanten (*cer1*, *cer6*, *cer9*, *cer16*) nach der Freilandwachstumsperiode des Jahres 2011 (Vgl. Abb. 35). Auf den Gelen 1 und 2 sind je vier biologische Replikate der Pflanzenlinien in je einem technischen Replikate aufgetragen. Auf den Gelen 3, 4, 5 und 6 sind je drei Replikate der *cer*-Linien in je zwei technischen Replikaten aufgetragen. Lediglich auf Gel 3 wurde ein Replikate der *cer1*-Mutante nur mit einem technischen Replikate betrachtet. Für den Wildtyp wurden vier biologische Replikate betrachtet und jeweils drei in unterschiedlichen Kombinationen auf den Gelen 3, 4, 5 und 6 aufgetragen (Replikate 1 und 2 des Wildtyps sind auf allen Gelen enthalten). M=Marker.

8. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuungskomitee, bestehend aus Frau Prof. Ute Hentschel Humeida, Herrn Prof. Markus Riederer, Frau Prof. Gwyn Beattie (Iowa State University, USA) und Frau PD Dr. Susanne Berger. Frau Prof. Hentschel Humeida als Erstgutachterin und Herrn Prof. Riederer danke ich für die Vergabe des interessanten Themas und für die Möglichkeit dieses am Lehrstuhl für Botanik II zu bearbeiten. Weiterhin bedanke ich mich bei ihnen für die vielen wichtigen Gespräche, die mir immer eine große Hilfe waren, sowie über die besondere finanzielle Unterstützung die mir den Besuch von mehreren internationalen Konferenzen ermöglichte. Auch Frau Prof. Beattie danke ich für die konstruktiven Anmerkungen und Ratschläge zum Fortgang meiner Arbeit. Frau PD Dr. Berger danke ich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens und das Interesse an Verlauf meiner Arbeit im Graduiertenkolleg 1342 „Lipid Signalling“.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft repräsentiert durch das Graduiertenkolleg 1342 „Lipid Signalling“ für die Finanzierung meiner Arbeitsstelle und die Übernahme von Verbrauchsmittel- und Reisekosten. Außerdem konnte ich von den Lehrveranstaltungen und dem Vortragsangebot des GK profitieren.

In diesem Zusammenhang danke ich auch der Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (GSLs), die meine Arbeit mit einem hervorragenden Angebot an Kursen zu Schlüsselqualifikationen ergänzt hat. Auch ihren Mitarbeitern, vor allem Dr. Rose Liebert, Dr. Gabriele Blum-Oehler, Susanne Fischer und Jennifer Braysher, die mich durch ihre kompetente Arbeit während der Doktorarbeit begleitet haben gilt mein Dank.

Ganz besonders danke ich Dr. Ulrich Hildebrandt. Als Kollege und inzwischen Lebenspartner stand er mir immer beratend zur Seite. Auch in stressigen Zeiten hatte er ein offenes Ohr für meine Fragestellungen, war immer zu hilfreichen Gesprächen bereit und zeigte echtes wissenschaftliches Interesse an meiner Arbeit.

Ich danke außerdem allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Hentschel, die mich durch technische Hilfe und interessante Gespräche unterstützt haben. Besonders danke ich Dr. Kristina Bayer und Christine Gernert für ihre Hilfe im Labor sowie Janine Kamke und Lucas Moitinho e Silva für Hilfe in bioinformatischen Fragen.

Dr. Susanne Schmitt möchte ich ebenfalls ganz besonders für beratende Gespräche zur Amplicon-Sequenzierung danken.

Dr. Thomas Griebel und Dr. Elham Attaran gilt mein Dank für die kollegiale und hilfsbereite Begleitung am Anfang meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an das „EM-Team“ - Daniela Bunsen, Claudia Gehring und Herrn Prof. Georg Krohne vom Lehrstuhl für Elektronenmikroskopie - für die vielen schönen Bilder.

Auch Dr. Michael Riedel gilt mein Dank für seine Beratung während der Wachsenanalysen und seine große Hilfsbereitschaft in Sachen Finanzverwaltung.

Ich möchte auch Johannes Hain von der statistischen Beratungsstelle für die hilfreiche und kompetente Beratung danken.

Besonders danke ich auch Andrea Knorz und Olga Frank für ihre Hilfe mit den GCs sowie Jutta Winkler-Steinbeck für die Pflanzenpflege. Auch Monika Noak und Wilma Kressmann danke ich für ihre Unterstützung in Verwaltungsfragen und für die Literaturbeschaffung.

Abschließend danke ich meinen Eltern und meinen Freunden für ihre mentale Unterstützung und außerdem meiner Mutter Elfriede Reisberg vom Lehrstuhl für Botanik I für Hilfe in der Materialbeschaffung.

Publikationen:

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2012) "Phyllosphere bacterial communities of trichome-bearing and trichomeless *Arabidopsis thaliana* leaves " *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 551-560.

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2013) „Distinct phyllosphere bacterial communities on *Arabidopsis* wax mutant leaves“ PLoS ONE *accepted*.

Präsentationen:

Internationale Tagungen:

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2010) „Investigations on the influence of trichomes on the bacterial diversity of *Arabidopsis* leaves“ Posterbeitrag, 9th International Symposium of the Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces, Corvallis, Oregon

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2011) „The influence of plant surface characteristics on microbial communities of *A. thaliana* leaves“ Posterbeitrag, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2011) „The influence of plant surface characteristics on microbial communities of *A. thaliana* leaves“ Posterbeitrag, Botanikertagung, Berlin

Veranstaltungen des Graduiertenkolleg 1342:

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2009) „The role of cuticular lipids in plant surface/microbe interactions“ Kurzvortrag, Annual Retreat des GK 1342, Pommersfelden

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2010) „Microbial life on *Arabidopsis* leaves – diversity analyses via molecular methods“ Kurzvortrag, Joint Symposium SFB 567 & GK 1342, Pommersfelden

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2010) „Investigations on the influence of trichomes on the bacterial diversity of *Arabidopsis* leaves“ Posterbeitrag, Summer Workshop des GK 1342, Würzburg

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2011) „The influence of plant surface characteristics on naturally colonizing bacterial communities of *A. thaliana* leaves“ Posterbeitrag, Begutachtung des GK 1342, Würzburg

Reisberg EE, Hildebrandt U, Riederer M, Hentschel U (2012) „The role of trichomes and cuticular lipids in plant surface/ microbe interaction“ Kurzvortrag, Joint Retreat des iGRAD *plant* & GK 1342, Düsseldorf