

**Erfassung der mikrobiellen Diversität
in verschiedenen Reisarten und Varietäten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs 2 Biologie / Chemie
der Universität Bremen

vorgelegt von
Torsten Thünen

Bremen 2005

Abkürzungen

ARISA	Automatet Ribosomal intergenic spacer analysis
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DIG	Digoxigenin
IGS	Intergenic spacer
LB	Luria Bertani
nif	Bezeichnung der Gene zur Stickstofffixierung (engl., nitrogen fixation)
OD ₅₇₈	Optische Dichte, bei der Wellenlänge von 578 nm am Spektralphotometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RISA	Ribosomal intergenic spacer analysis
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl., sodium dodecylsulfate)
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment Längenpolymorphismus

1	Einleitung	3
1.1	Unterschiedliche Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität	4
1.2	Mögliche Fehlerquellen bei der Ermittlung der Diversität durch molekularbiologische Methoden	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Gase	8
2.1.3	Puffer und Lösungen	8
2.1.4	Stämme und Plasmide	10
2.1.5	Untersuchte Pflanzen	10
2.1.6	Medien und Zellanzucht	11
2.1.6.1	Medien	11
2.1.6.2	Antibiotika und sonstige Zusätze	12
2.1.6.3	Zellanzucht	12
2.1.6.4	Wachstumskontrolle	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Standardmethoden im Umgang mit Nukleinsäuren	13
2.2.2	Sterilisierungsmethoden	13
2.2.3	Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes	13
2.2.4	Fällung von Nukleinsäuren	13
2.2.5	Plasmid Präparation	14
2.2.6	Restriktionsverdau	14
2.2.7	Auftrennung von Nukleinsäuren	14
2.2.7.1	Agarosegele	14
2.2.7.2	Polyacrylamid Gele	15
2.2.8	Isolation von RNA	15
2.2.8.1	Chang Methode	15
2.2.8.2	Hot-Phenol	16
2.2.9	Aufreinigung von Nukleinsäuren	17
2.2.10	Klonierung von PCR Fragmenten	17
2.2.11	Transformation	17
2.2.12	Herstellung von Sonden	17
2.2.13	Anlegen von Klonbanken	17
2.2.14	Testen von Klonbanken	18
2.2.15	Southernblot	19
2.2.16	Sequenzierung	19

2.2.17	RT-PCR und PCR	20
2.2.18	Phylogenetische Auswertung	22
2.2.18.1	<i>nifH</i> Sequenzen	22
2.2.18.2	16S rRNA Sequenzen	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Optimierung.....	23
3.1.1	Modifikation der RNA Extraktion nach Hurek (Hurek, Handley <i>et al.</i> 2002) ...	23
3.1.2	Optimierung verschiedener RNA Isolationsmethoden	24
3.1.3	Primerdesign	36
3.1.4	Kalibrierung der PCR und RT-PCR für most-probable-number (MPN) Berechnungen	40
3.1.5	Modifikation der rRNA intergenic spacer analysis (RISA).....	43
3.1.6	Vergleich der <i>nifH</i> Expressionslevel von Kulturreis und Wildreis.....	48
3.1.7	Erfassung der Diversität auf <i>nifH</i> Gen Ebene	49
3.1.8	Erfassung der Diversität auf 16S rDNA Ebene	52
4	Diskussion	59
4.1.1	Optimierung der Extraktionsmethoden.....	59
4.1.2	Überprüfung der RNA Qualität	60
4.1.3	Primerdesign	65
4.1.4	Kalibrierung der <i>nifH</i> PCR und RT-PCR für MPN Berechnungen.....	68
4.2	Erfassung der Diversität	69
4.2.1	Erfassung der <i>nifH</i> Expressionslevel verschiedener Reisarten	69
4.2.2	Erfassung der <i>nifH</i> Diversität verschiedenen Reisarten.....	70
4.2.3	Erfassung der 16S Diversität verschiedener Reisarten	72
4.2.4	Abhängigkeit der ermittelten Diversität von der Extraktionsmethode.....	73
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literatur	77
7	Anhang	84
7.1	Ermittlung des <i>nifH</i> Expressionslevels.....	84
7.2	Accession-Nummern der ermittelten <i>nifH</i> mRNA Sequenzen	85
	Danksagung	86

1 Einleitung

Für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist Reis das Grundnahrungsmittel. Er deckt 27% des Energie und 20% des Proteinbedarfs in den Entwicklungsländern und, alleine in Asien und Afrika betreiben über 100 Millionen Haushalte die Kultivierung von Reis. Schätzungen gehen davon aus, dass die Bevölkerungszahl im Jahre 2030 die 8,3 Milliarden Grenze überschreitet, und dass für einen Großteil dieser Menschen Reis das Grundnahrungsmittel sein wird (www.fao.org).

Dieser enorme Bedarf an Reis kann nur durch die Züchtung immer ertragreicherer Reisarten und eine extensive Düngung der Pflanzen gedeckt werden. Mehr als 20% des weltweit produzierten Stickstoff-Düngers kommt auf Reisfeldern in Asien zum Einsatz. Nur ca. 30 bis 40% des eingebrachten Düngers wird jedoch von der Pflanze aufgenommen. (www.riceproducers.com). Somit kommt es zu einer Einbringung von immer mehr anorganisch gebundenem Stickstoff in die Umwelt, was ernste Konsequenzen nach sich zieht. So konnte gezeigt werden, dass es durch eine übermäßige Düngung zu einer Abnahme der Artenvielfalt kommen kann und so die entsprechenden Ökosysteme auf Schwankungen nur bedingt reagieren können (Aerts und Berendse 1988). Auch der durch Denitrifikation in die Atmosphäre gelangende Stickstoff hat negative Einflüsse auf die Umwelt.

Eine Alternative zur Chemischen Düngung ist die Nutzung von Symbiosen zwischen Pflanzen und Stickstofffixierenden Bakterien, wie zum Beispiel die Leguminosen/Rhizobien Symbiose. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte Knöllchensymbiose, da die Bakterien die Pflanze zur Bildung von Knöllchen anregen. In diesen differenzieren sich die Bakterien zu Bakteroiden und beginnen mit der Stickstofffixierung. Auch bei einigen *Alnus* Arten tritt eine Knöllchensymbiose auf. Hierbei handelt es sich um eine Symbiose mit dem Actinomycet *Frankia alni* (Sitte *et al.* 2002). Bei diesen Pflanzen wurde durch eine Reihe von Versuchen nachgewiesen, dass sie biologisch fixierten Stickstoff von den Microsymbionten zur Verfügung gestellt bekommen und diesen im Gegenzug Photosyntheseprodukte zugänglich machen (Mylona, Pawlowski und Bisseling 1995). Schätzungen gehen davon aus, dass durch diese Art der Symbiosen zwischen 32 und 53 Tg Stickstoff pro Jahr fixiert werden (Galloway *et al.* 1995).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch in Gräsern lebende Stickstofffixierende Bakterien innerhalb ihres Wirtes Stickstoff fixieren und diesen den Pflanzen zur Verfügung stellen. Dieses konnte bei Zuckerrohr (*Saccharum* sp.) (Sevilla *et al.* 2001), sowie Kallar Gras (*Leptochloa fusca*) (Hurek *et al.* 2002) gezeigt werden. Um eine biologische Stickstofffixierung als Symbiotisch zu bezeichnen, sind drei Grundvoraussetzungen erforderlich. Zum einen müssen innerhalb der Pflanze oder der Rhizosphäre eine ausreichende Zahl an diazotrophen Bakterien vorhanden sein, um die beobachtete

Stickstofffixierung zu erklären, zum anderen müssen diese Bakterien in der Lage sein, innerhalb der Pflanze oder in direkter Assoziation mit ihr Stickstoff zu fixieren. Drittens müssen sie für die Pflanze von Nutzen sein, indem sie ihr den biologisch fixierten Stickstoff zugänglich machen (James 2000).

Einzig bei *Azoarcus* Kallargras Beziehung konnten diese drei Aspekte bei Laborpflanzen beobachtet werden und es gibt Hinweise, dass dieses auch im Freiland der Fall ist (Hurek *et al.* 2002). Daher wird diese Beziehung in der Literatur, so zum Beispiel von Dalton (Dalton *et al.* 2004) als symbiotisch bezeichnet. Unklar ist jedoch weiterhin, bis zu welchem Grad die Pflanze ihren Stickstoffbedarf durch die symbiotische Beziehung deckt.

Kandidaten, von denen man auf Grund von Isolationsexperimenten annimmt, dass sie für eine mögliche Symbiose mit Mais und Reispflanzen in Frage kommen, sind Bakterien der Gattungen *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* und *Rhizobium* (Patriquin, Döbereiner und Jain 1983; Boddey *et al.* 1995; Triplett 1996; Malik *et al.* 1997; Stoltzfus *et al.* 1997; Yanni *et al.* 1997; James *et al.* 2000).

Um auf lange Sicht bei Reis ein System zu etablieren, welches ähnliche Werte liefert wie sie von dem Rhizobien/Leguminosen System bekannt sind, ist es notwendig, verschiedene Reispflanzen auf ihre mikrobielle Diversität hin zu untersuchen, um mögliche Symbiosepartner zu identifizieren. Dieses ist nötig, um ein Laborsystem zu entwickeln und so eventuelle symbiotische Beziehungen genauer untersuchen zu können. Isolationsexperimente an Reis haben gezeigt, dass ungefähr 90% der von oberflächensterilisierten Reis-Wurzeln und -Halmen isolierten Bakterien nicht zu den Stickstofffixierern gehören. Hierbei wurden sowohl Wild- als auch Kulturreisarten untersucht (Barraquio, Revilla und Ladha 1997). Zwar gibt es Fälle wie bei Kallargras, bei dem 100% der Isolate als Stickstofffixierer identifiziert wurden (Reinhold-Hurek *et al.* 1986), jedoch handelt es sich hierbei eher um die Ausnahme als um die Regel. Dieses, zusammen mit den Schätzungen, dass nur ca. 1% aller Bakterien kultivierbar sind (Amann, Ludwig und Schleifer 1995), zeigt, dass es sinnvoll ist, auf kulturunabhängige Verfahren zurückzugreifen, um die mikrobielle Diversität innerhalb der Reisswurzeln zu bestimmen. Hierfür stehen einige verschiedene Methoden zur Verfügung.

1.1 Unterschiedliche Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität

Die Nutzung molekularbiologischer Methoden erlaubt einen genaueren Einblick in die Diversität. Hierbei werden bestimmte Marker (Nukleinsäuren, Lipide) aus den Proben isoliert und auf unterschiedliche Weise miteinander verglichen.

Die Methoden lassen sich in zwei Untergruppen einteilen. Zum einen die biochemisch basierten und zum anderen die Nukleinsäure-basierten Methoden. Zu ersteren zählen die Keimzahl Bestimmung, eine schnelle und kostengünstige Methode, welche jedoch den

Nachteil hat, dass unkultivierbare Organismen nicht erkannt werden und schnellwachsende Organismen bevorzugt erkannt werden (Trevors 1998; Tabacchioni *et al.* 2000). Eine weitere Methode ist das Community level physiological profiling (CLPP), jedoch ist auch diese Methode auf die kultivierbaren Organismen beschränkt und bevorzugt schnellwachsende Organismen. Zudem können nur solche Organismen isoliert werden, welche die angebotenen Kohlenstoffquellen nutzen können (Garland 1991; Garland 1996; Classen *et al.* 2003). Eine kulturunabhängige Methode stellt die Fettsäure-methylester Analyse (FAME) dar, hierbei kann es jedoch Verfälschungen durch andere Mikroorganismen innerhalb der Probe kommen (Siciliano 1998; Zelles 1999). Im Gegensatz zur weiter unten beschriebenen Identifikation über die Nukleinsäure Sequenz der ribosomalen Untereinheiten, ist hierbei jedoch nur eine Auflösung bis auf Familien Ebene möglich. Daher ist diese Methode nicht geeignet, um Schlüsselspezies eines Ökosystems zu identifizieren.

Bei den nukleinsäurebasierenden Methoden ist der am häufigsten verwendete Marker die Nukleotidsequenz der kleinen ribosomalen Untereinheit 16S (bei Prokaryonten) und 18S (bei Eukaryonten). Hierbei kommen verschiedene Techniken zur Anwendung, um die isolierten Nukleotidsequenzen miteinander zu vergleichen. Die gängigste, aber auch eine der arbeitsintensivsten Methoden ist das Anlegen von Klonbanken durch das Klonieren von PCR Produkten, gefolgt von einer Sequenzierung der ribosomalen Gensequenz der einzelnen Klone (Muyzer und Smalla 1999). Ein Vergleich der so erhaltenen Sequenzen untereinander und der Abgleich mit Sequenzen aus der mittlerweile sehr umfangreichen Datenbank, erlaubt eine phylogenetische Einteilung der Bakterien. Neben der reinen Sequenzierung der ribosomalen Gene existieren weitere Methoden, um die mikrobielle Diversität einer Umweltprobe zu analysieren.

Die ursprünglich zu Detektion von Punktmutationen verwendeten Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) und Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese (TGGE) wurde von Muyzer (Muyzer, de Waal und Uitterlinden 1993) zur Bestimmung der Diversität eingesetzt. Sie beruht auf dem unterschiedlichen Denaturierungsverhalten von doppelsträngigen Nukleinsäuren auf grund ihres unterschiedlichen GC-Gehaltes. Hieraus resultiert ein verändertes Laufverhalten im Polyacrylamidgel (Muyzer 1999). Bei der DGGE erfolgt die Denaturierung chemisch, bei der TGGE durch Temperatur.

Die ebenfalls ursprünglich zur Detektion von Punktmutationen verwendete Methode der Einzelstrang Konformationspolymorphismus (SSCP) Analyse (Orita *et al.* 1989), wurde später auch zur Analyse der Diversität von Mikrobiellen Gemeinschaften angewendet (Peters *et al.* 2000).

Eine weitere Methode, welche zur Erfassung der mikrobiellen Diversität in Umweltproben eingesetzt werden kann, ist die Terminale Restriktionsfragment Längenpolymorphismus Analyse (T-RFLP). Hierbei wird das Zielgen mittels PCR amplifiziert, wobei ein Primer mit

einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Nach einem anschließenden Verdau mit Restriktionsenzymen, wird das PCR-Produkt auf einem Acrylamidgel aufgetrennt (Liu *et al.* 1997).

Die Heterogenität in der Länge und der Sequenz des Bereiches zwischen der 16S rRNA und der 23S rRNA (intergenic spacer / IGS) macht sich die Automatisierte ribosomale intergenic spacer Analyse (ARISA) zu nutzen (Fisher und Triplett 1999). Hierbei wird der IGS Bereich mittels PCR amplifiziert, wobei ein Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die Auftrennung der PCR Produkte auf einem Polyacrylamidgel erlaubt einen Einblick in die Diversität innerhalb der untersuchten Probe.

Da in dieser Arbeit die Diversität von Stickstofffixierenden Bakterien untersucht werden soll ist es wichtig, solche Bakterien zu identifizieren, welche in der Pflanze aktiv Stickstoff fixieren. Die Diversität auf ribosomaler Ebene, wie sie in den oben beschriebenen Methoden erfasst wird, gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, da die reine ribosomale Sequenz keine Aussage zulässt, ob es sich wirklich um einen Stickstofffixierer handelt. Zudem kann anhand dieser Informationen nicht erkannt werden, ob die identifizierten Organismen auch aktiv Stickstoff fixieren. Die starke evolutionäre Konserviertheit des Nitrogenase Gens *nifH* ermöglicht jedoch ebenfalls eine phylogenetische Analyse der in den Pflanzen vorkommenden Bakterien. Die auf diese Weise ermittelte phylogenetische Verteilung deckt sich weitestgehend mit der durch Analysen der 16S rRNA. (Ueda *et al.* 1995). Derartige Untersuchungen an *nifH* mRNA erlauben zudem Aussagen über die Aktivität der einzelnen Bakteriengruppen sowie deren Quantifizierung (Hurek *et al.* 2002).

Untersuchungen zur Aktivität von Stickstofffixierern in Umweltproben wurden bereits im Darm von Termiten (Noda *et al.* 1999) und in Bodenproben (Burgmann *et al.* 2003) durchgeführt.

1.2 Mögliche Fehlerquellen bei der Ermittlung der Diversität durch molekularbiologische Methoden

Die Verwendung von molekularbiologischen Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität gewährt einen weitaus exakteren Einblick, als dieses durch Kultivierungs-Experiment möglich ist. Allerdings sind auch hier Einschränkungen zu machen.

Ein Grossteil dieser Methoden beruht auf einer Extraktion von Nukleinsäuren und einer anschließenden Amplifikation eines Gens durch PCR bzw. RT-PCR. Bei beiden Schritten müssen mögliche Fehlerquellen mit einkalkuliert werden. Bei Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität von Bodenproben konnte gezeigt werden, dass die dort verwendeten Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren durch eine geringe Effizienz, hervorgerufen durch eine unvollständige Lyse der Bakterien und eine Anlagerung der Nukleinsäure an Bodenpartikel gekennzeichnet sind (Frostegard *et al.* 1999; Krsek und Wellington 1999).

Dass die gewählte Extraktionsmethode bei Bodenproben einen Einfluss auf das Ergebnis der untersuchten Diversität hat, konnte von Martin-Laurent (Martin-Laurent *et al.* 2001) gezeigt werden.

Die PCR bzw. RT-PCR ist ein weiterer Faktor, welcher zu einer Fehleinschätzung der tatsächlichen mikrobiellen Diversität innerhalb einer Umweltprobe führen kann. Die Wahl der Primer ist ein wichtiges Kriterium, aber auch die Bedingungen für die PCR sowie mögliche Fehler während der Amplifikation spielen eine Rolle. Während einer PCR Reaktion können verschiedene Probleme auftreten, die in zwei Klassen, PCR Selektion und PCR Shift unterteilt werden (Wagner *et al.* 1994). Zur Klasse der PCR Selektion gehören die Abhängigkeit der ermittelten Diversität einer Umweltprobe von der Konzentration des bei der PCR eingesetzten Templates (Chandler, Fredrickson und Brockman 1997), sowie die Genomgröße der in der Probe enthaltenen Organismen (Farrelly, Rainey und Stackebrandt 1995). Zur Klasse des PCR Drifts zählen Ereignisse während der frühen Phase der Amplifikation zu einem Zeitpunkt, bei welchem noch die original Nukleinsäure als Template dient. Im Unterschied zur PCR Selektion sind die Ereignisse des PCR Drifts nicht reproduzierbar (Wagner *et al.* 1994).

Das Ziel dieser Arbeit gliedert sich in zwei Bereiche. In einem ersten Abschnitt sollten Methoden zur Ermittlung der mikrobiellen Diversität in Wurzeln von *Oryza*-Arten entwickelt oder weiterentwickelt werden. Hierbei soll gewährleistet werden, dass es möglich ist, mit den verwendeten Methoden möglichst die gesamte mikrobielle Diversität zu erfassen und Fehler, wie sie oben beschrieben wurden, weitestgehend zu eliminieren.

Im zweiten Abschnitt sollten diese Methoden dazu verwendet werden, die mikrobielle Diversität verschiedener Reisarten zu untersuchen. Hierbei soll zum einen der *nifH* Expressionslevel bei verschiedenen Wild – und Kulturreisarten verglichen werden, da in früheren Untersuchungen eine starke Diskrepanz des *nifH* Expressionslevels zwischen diesen zwei Typen beobachtet werden konnte (Hurek, unveröffentlichte Daten). Zum anderen sollen die Bakterien identifiziert werden, welche für die Stickstofffixierung verantwortlich sind, um so eventuelle Symbiosepartner zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Komplexmedienbestandteile und Agar stammten von Difco (Detroit, Michigan, USA). Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach) und Amersham Biosciences (Freiburg) geliefert. Agarose wurde von Biozym (Hess.Oldendorf) und Serva (Heidelberg) bezogen.

2.1.2 Gase

Der Stickstoff und die synthetische Luft zur Begasung des Fermenters (Reinheit jeweils 99,993%) wurden von Messer Griesheim (Siegen) bezogen.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen für DNA-Arbeiten wurden mit autoklaviertem Aqua bidest. angesetzt. Für RNA-Arbeiten wurden die Puffer und Lösungen sowie Aqua bidest. mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, über Nacht bei 37 °C gerührt und anschließend autoklaviert. Puffer, deren Chemikalien nicht mit DEPC behandelt werden konnten, wie z.B. Tris, im SSTE-Puffer, wurden mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. und speziell für RNA-Arbeiten vorgesehenen Chemikalien angesetzt. In einigen Fällen wurde gekauftes Wasser (ICN) verwendet. Nach Einführung von RNasecure (Ambion Inc.) wurden Wasser, Lösungen sowie Puffer unterhalb eines Volumens von 1 ml nach Angaben des Herstellers behandelt. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind nachfolgend aufgelistet. Selten verwendete Puffer sind bei den entsprechenden Methoden erwähnt.

Blocking Reagenz (10× konzentriert)

100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
150 mM	NaCl
10 % (w/v)	Blocking Reagenz

Denhardts (100× konzentriert)

2 % (w/v)	BSA
2 % (w/v)	Ficoll
2 % (w/v)	PVP-360

Denaturierungslösung

1,5 M	NaCl
500 mM	NaOH

DIG-Puffer 1

100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
150 mM	NaCl

Material und Methoden

DIG-Puffer 2 (Blockierpuffer)

100 mM	Maleinsäure (pH 7,5)
150 mM	NaCl
1 % (w/v)	Blocking Reagenz

<u>Hybridisierungslösung</u> (für Oligonukleotid-Sonden)	
4 ×	SET
10 ×	Denhardt's

DIG-Puffer 3

100 mM	Tris
100 mM	NaCl
	pH 9,5

<u>Neutralisierungslösung</u>	
500 mM	Tris
5 M	NaCl
1 mM	EDTA (pH 7,0)

Standard-Ladepuffer (10 × konzentriert)

20% (w/v)	Ficoll 400
0,1% (w/v)	Bromphenolblau
0,1% (w/v)	Orange G
0,1% (w/v)	Xylencyanol
1mg/ml	Ribonuklease A

<u>SET-Puffer (10× konzentriert)</u>	
1,5 M	NaCl
300 mM	Tris (pH 8,3)
20 mM	NaEDTA (pH 8,0)

PCR-Ladepuffer (10 × konzentriert)

20 % (w/v)	Ficoll 400
0,1 % (w/v)	Xylencyanol
0,1 % (w/v)	Orange G
100 mM	EDTA

<u>SSC-Puffer (20 × konzentriert)</u>	
3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat Dihydrat pH 7,0

Ladepuffer für Polyacrylamidgele

8 ml	Formamid (entionisiert)
1 ml	TBE (10 × konzentriert)
1 ml	Aqua bidest.
5 mg/ml	Dextran Blau 2000
ad 10 ml	H ₂ O

<u>TAE-Puffer</u>	
40mM	Tris-Acetat
4mM	EDTA
	pH 8,0

Hybridisierungslösung (für Gensonden)

6 ×	SSC
2% (v/v)	Denhardts (100× konz.)
0,5% (w/v)	SDS

<u>TE-Puffer</u>	
10mM	Tris
1mM	EDTA
	pH 8,0

<u>TBE-Puffer</u>	
1 M	Tris
0,83 M	Borsäure
10 mM	EDTA

2.1.4 Stämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

- Chemisch kompetente *E. coli* TOP 10-Zellen (Genotyp: F- *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* M15 *lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- *Azoarcus* sp. BH72 (Reinhold-Hurek *et al.* 1986)

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

- pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

2.1.5 Untersuchte Pflanzen

Ein Teil der untersuchten Reiswurzeln stammten aus Namibia und werden in dieser Arbeit als Namibia 2, Namibia 3, Namibia 4, Namibia 5o und Namibia 7 bezeichnet. Bis auf Namibia 7 handelt es sich bei allen Pflanzen um *Oryza longistaminata*. Namibia 7 wurde als Kallar Gras (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) identifiziert. Die Proben wurden von Prof. Barbara Reinhold-Hurek im Januar 2002 genommen, die genauen Orte der Probenentnahme sind in Abb. 1 dargestellt. Weitere Proben wurden vom International Rice Research Institute (IRRI) auf den Philippinen zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die Proben *Oryza longistaminata* 22 bzw. 22a (Wildreis) , sowie um die Kulturreisarten *Oryza sativa* IR72, *Oryza sativa* IR42 und *Oryza sativa* New Plant Type (NPT). Neben diesen Pflanzen wurden noch weitere aus dem Labor-internen Gewächshaus untersucht. Hierbei handelt es sich um *Oryza longistaminata*, welcher über mehrere Jahre hinweg in einem nicht gedüngten Boden gehalten wurde. Diese Pflanze wird im weiteren als *O. longistaminata* „Big Pot“ bezeichnet. Eine weitere auf stickstoffhaltigem Boden gewachsene Pflanze war *O. sativa* IR72, im folgenden als *O. sativa* IR72 Pot bezeichnet.

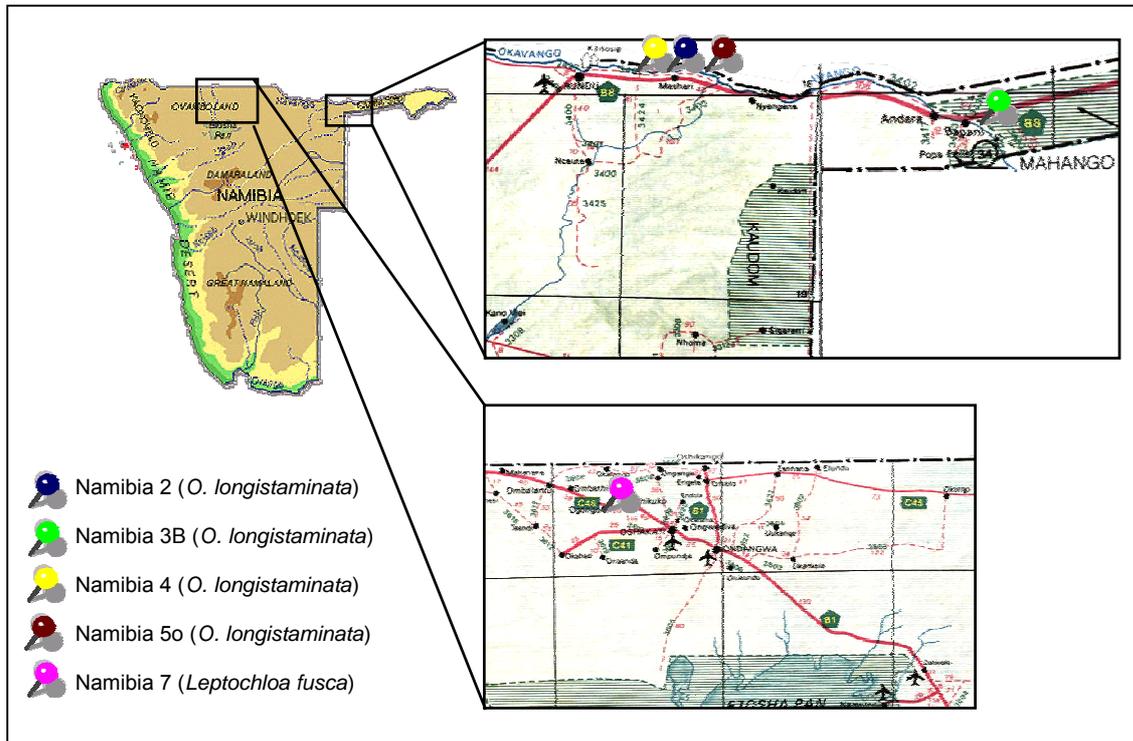


Abb. 1: Orte der Probenentnahme in Namibia.

2.1.6 Medien und Zellanzucht

2.1.6.1 Medien

Medien für *E. coli*

Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l	Bacto-Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl
	pH 7,0

Material und Methoden

Medien für *Azoarcus* sp.:

SM/-N-Medium (Reinhold-Hurek *et al.* 1986)

1,1 g/l	NaCl
0,2 g/l	MgSO ₄ x 7H ₂ O
26,4 mg/l	CaCl ₂ x 2H ₂ O
10 mg/l	MnSO ₄ x H ₂ O
2 mg/l	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O
66 mg/l	Fe-(III)-EDTA
5 g/l	Äpfelsäure
4,5 g/l	KOH
0,4 g/l	KH ₂ PO ₄
0,6 g/l	K ₂ HPO ₄
	pH 6,8

Medien für *Bacillus subtilis*

Siehe Medien für *E. coli*.

2.1.6.2 Antibiotika und sonstige Zusätze

Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren zugefügt. Es wurde mit Hilfe einer Stammlösung eine Endkonzentration von 50 µg/ml Medium eingestellt. Bei Flüssigmedien wurden die Antibiotika nach Abkühlen auf Raumtemperatur zugegeben. Medien, die mit Agar versetzt waren, wurden bis auf ca. 50°C abgekühlt, mit dem Antibiotikum auf ebenfalls 50 µg/ml eingestellt und anschließend in die Petrischalen gegossen.

Das für die Blau-Weiß-Selektion nötige 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) wurde vor dem Ausplattieren auf die Agarolatten aufgebracht. Hierzu wurden 20 µl einer 2%igen X-Gal Stammlösung in N,N-Dimethylformamid auf die Platten gegeben und mit einem abgeflammten Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt.

2.1.6.3 Zellanzucht

Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37°C in LB-Medium. Je nach gewünschter Zellmasse wurden entweder 2 ml Medium in einem Reagenzglas oder 50 ml Medium in einem 500 ml Erlenmeyer Kolben mit je einer Einzelkolonie angeimpft und auf einem Rotationsschüttler bzw. Orbitalschüttler inkubiert.

Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72

Die Anzucht von *Azoarcus* sp. BH72 erfolgte wie bei Hurek (Hurek *et al.* 1987) beschrieben.

2.1.6.4 Wachstumskontrolle

Das Wachstum einer Bakterienkultur wurde anhand ihrer optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) verfolgt, hierzu wurde die Trübungsdifferenz zwischen Kultur und unbewachsenem Medium gemessen.

2.2 Methoden

2.2.1 Standardmethoden im Umgang mit Nukleinsäuren

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in (Ausubel *et al.* 1995) angegebenen Standardprotokolle verwendet.

Für den Umgang mit RNA wurden RNase-, DNase- und pyrogenfreie Pipettenspitzen (Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf) und RNase-, DNase-freie Reaktionsgefäße (Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht) verwendet. Lösungen wurden soweit möglich mit 0,1% DEPC versetzt, für mindestens 1 h bei 37°C gerührt und anschließend 40 min bei 121°C autoklaviert.

2.2.2 Sterilisierungsmethoden

Für den Umgang mit Nukleinsäuren verwendete Lösungen, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen etc. wurden für 30 min bei 121°C autoklaviert. Glasgeräte und Gefäße wurden durch trockene Hitze (4h bei 170°C) sterilisiert.

2.2.3 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Zur Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes einer Lösung wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Bei zu erwartender Konzentration von mehr als 100 ng/µl wurde der Gehalt an Nukleinsäure durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Hierbei wurde eine 1:50 bis 1:100 Verdünnung der Nukleinsäurehaltigen Lösung gegen das Lösungsmittel gemessen. Der Gehalt an Nukleinsäure wurde daraufhin nach Sambrook (Sambrook, Fritsch und Maniatis 1989) berechnet.

Lag die zu erwartende Konzentration unterhalb von 100 ng/µl, wurde die Konzentration mit Hilfe des Picofluor Photometers nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.4 Fällung von Nukleinsäuren

Sich in Lösung befindende Nukleinsäuren wurden nach Zugabe von zwei bis drei Volumina absoluten Ethanol und 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) für 30 bis 60 min bei –70°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und $13.000 \times g$ zentrifugiert. Alternativ erfolgte eine Zugabe von einem Volumen an Isopropanol, einer Inkubation für 5 min bei RT,

gefolgt von einer anschließenden Zentrifugation für 30 min bei Raumtemperatur und $13.000 \times g$. Bei beiden Alternativen erfolgte ein anschließendes Waschen des Präzipitats durch Zugabe von 80%igem, 4°C kaltem Ethanols und anschließender Zentrifugation bei 4°C und $13.000 \times g$ für 15 min. Im Anschluss hieran wurde das Präzipitat unter Vakuum getrocknet (Gene Vac von SF50, Biometra, Göttingen) und in TE-Puffer oder Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.5 Plasmid Präparation

Zur Isolation von Plasmidmengen bis zu 30 µg wurde die Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979), modifiziert nach Ausubel *et al.* (1987), verwendet. Hierbei handelt es sich um eine alkalische Lyse durch eine NaOH/SDS-haltige Lösung mit einer anschließenden Entfernung von Proteinen und SDS durch eine Aussalzung mit 3 M Kaliumacetat. Im Anschluss hieran erfolgte eine Chloroform-Phenol-Isoamylalkohol Extraktion und eine Präzipitation des Plasmides durch Zugabe von Isopropanol (2.2.4).

2.2.6 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und 5 Units Restriktionsendonuklease für zwei bis drei Stunden durchgeführt. Inkubationstemperatur und Pufferzusammensetzung wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers gewählt.

2.2.7 Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren lassen sich auf Grund ihrer negativen Ladung und ihres, von ihrer Länge abhängigen, unterschiedlichen Laufverhaltens in Agarose- bzw. Polyacrylamidgelen durch Anlegen einer Spannung auftrennen.

2.2.7.1 Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA wurden 1 bis 2%ige Agarose Gele in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) verwendet. Die angelegte Spannung variierte zwischen 3,5 bis 5 V/cm, und die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der gewünschten Auflösung. Es wurden entweder mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid vorgefärbte Gele verwendet, oder es erfolgte eine anschließende 20 minütige Färbung in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml).

Als Größenstandard diente mittels *Pst*I verdaute DNA des Lambda Phagen.

2.2.7.2 Polyacrylamid Gele

Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäure Fragmente wurden Polyacrylamidgele zwischen 3% und 40% in 1 × ALF-TAE Puffer verwendet. Die Auftrennung von DNA erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen bei Raumtemperatur. RNA wurde in 8 M Harnstoffgelen bei 60°C aufgetrennt. Hierbei handelt es sich um denaturierende Bedingungen, um die Bildung von Sekundärstrukturen der RNA zu verhindern. Durch die Auftrennung bei 60°C werden zusätzlich Ribonucleasen inaktiviert.

Die Auftrennung erfolgte bei 20 – 60 V/cm. Die Dauer der Auftrennung richtete sich nach der gewünschten Auflösung.

Die Gele wurden anschließend in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (50 µg/ml) gefärbt und mit Hilfe des Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, part of Amersham Pharmacia Biotech) eingescannt. Hierbei wurden, soweit nicht anders angegeben, folgende Parameter verwendet: Fluorescence mode; 500V: Medium sensitivity; 610 BP 30 / Green (523 nm); focal plane = Platen.

Als Größenstandart diente mittels *PstI* verdaute DNA des Lambda Phagen, für RNA wurde die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

2.2.8 Isolation von RNA

2.2.8.1 Chang Methode

Diese Methode dient zur Gewinnung von bakterieller RNA aus Wurzelproben. Es handelt sich um ein modifiziertes Protokoll von Chang *et al.* (1993). Die Modifikationen wurden von Dr. Thomas Hurek durchgeführt (Hurek *et al.* 2002). Die Methode beruht auf einer mechanischen Zerstörung des Wurzelgewebes und einer anschließenden chemischen Lyse der Bakterien. Für den Extraktionspuffer wurde zunächst eine Lösung aus 100 mM MOPS (pH 8,0; 25 mM EDTA (pH 8,0) und 2 M NaCl hergestellt. Diese wurde für 1 Stunde mit 0,1% (v/v) DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. Hierauf wurde die Lösung auf 2% (w/v) CTAB; 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidone 40K und 0,5 g/l Spermidin eingestellt und erneut autoklaviert. Unmittelbar vor Verwendung des Puffers wurden diesem 2% (v/v) β-Mercaptopropandiol zugegeben. Durch die Verwendung von PVP und β-Mercaptopropandiol im Extraktionspuffer wird eine reduzierende Umgebung geschaffen, welche eine Oxidation phenolischer Bestandteile unterbindet und so verhindert, dass sich diese irreversibel an die Nukleinsäure anlagern. Die hohe Konzentration an NaCl (2M) im Puffer führt dazu, dass Polysaccharide ausfallen (Fang, Hammar und Grumet 1992) und dient des weiteren zur Entfernung des als Detergenz verwendeten CTAB. Daher ist diese Methode besonders geeignet, um Nukleinsäuren aus Proben mit einem hohen Gehalt an phenolischen Bestandteilen und Polysacchariden zu isolieren. Extraktionen wurden von ca. 700 mg Wurzelproben durchgeführt. Nach dem Mörsern in flüssigem Stickstoff wurde die

Probe in 15 ml, auf 2% Mercaptopropandiol eingestellten, Extraktionspuffer aufgenommen. Hierauf wurde das Pflanzengewebe durch die Verwendung eines Glaspotters zerstört. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und zum klaren Überstand Proteinase K zugegeben. Hiernach wurde das Pellet drei mal mit sterilem TE-Puffer gewaschen und anschließend in TE-Puffer + 25% Polyethylenglykol (PEG 6000) aufgenommen. Im Anschluss hieran erfolgte eine Lysozym Behandlung mit 1 mg/ml Lysozym für 20 min bei 37 °C. Nachdem die Probe auf 2% SDS und 1 mg/ml Proteinase K eingestellt wurde, erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 37 °C. Im Anschluss hieran wurden 15 ml Extraktionspuffer zugegeben und die Probe für 30 min bei 65 °C inkubiert. Darauf hin wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einem Volumen Chloroform versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 × g und Raumtemperatur für 10 min, wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10.000 × g und bei Raumtemperatur für 20 min wurde zum Überstand ¼ Volumen 10 M Lithiumchlorid gegeben und die Proben über Nacht auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 × g und 4 °C für 30 min. Das Pellet wurde in 500 µl 65 °C warmen SSTE-Puffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss hieran erfolgte eine erneute Chloroform Extraktion mit anschließender Fällung des wässrigen Überstandes mit zwei Volumen 96%igem Ethanol. Nach dem zweimaligen Waschen in 80%igem Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 25 µl DEPC behandeltem Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.8.2 Hot-Phenol

Für die Extraktion von RNA mittels der Hot-Phenol Methode wurde das Protokoll nach Aiba (*Aiba, Adhya und de Crombrughe 1981*) verwendet. Hierbei wurde der Hot-Phenol-Puffer und das mit 20 mM Natriumacetat pH 5,2 equilibrierte Phenol auf 60 °C erwärmt. Das Pellet einer 50 ml Kultur mit einer ungefähren OD (578 nm) von 1 wurde in dem Hot-Phenol-Puffer resuspendiert und anschließend das equilibrierte Phenol hinzu gegeben. Während einer anschließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C wurde der Ansatz mehrmals gut durchmischt, um einer Phasentrennung vorzubeugen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 × g bei RT für 15 min. Darauf hin wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die oben beschriebene Phenol Extraktion zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der wässrige Überstand mit 3 Volumen 96%igem Ethanol und 1/9 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, gemischt und über Nacht bei –20 °C inkubiert.

2.2.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.10 Klonierung von PCR Fragmenten

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten, wurde entweder das TOPO-TA Cloning Kit oder das TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Beide Verfahren beruhen auf dem Blunt End Klonierungsverfahren, bei dem das PCR-Produkt ungerichtet in den linearisierten Vektor kloniert wird. Als Vektoren dienten entweder der pCR 4 oder der pCR 2.1 Vector. Der pCR 4 Vektor verfügt über ein Selbstmord Gen, was gewährleistet, dass nur erfolgreich transformierte Zellen überleben. Bei dem pCR 2.1 Vektor erfolgte die Auswahl der positiven Klone über Blau-Weiß-Auswahl.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.11 Transformation

Die Transformation erfolgte in TOP10 chemisch-kompetenten Zellen der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Diese Methode beruht darauf, dass chemisch kompetente *E. coli* Zellen, DNA durch einen 30 sec. Hitzeschock bei 42 °C aufnehmen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.12 Herstellung von Sonden

Oligonukleotid-Sonden wurden direkt vom Hersteller bezogen. Die Herstellung von PCR-Sonden wurde wie folgt durchgeführt: Das entsprechende Fragment wurde über eine PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel aufgereinigt. Hierbei wurde das QiaQuick Gel Elution Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Volumen des gewonnenen Fragmentes wurde auf 16 µl in der Speedvac reduziert, für 10 min bei 100°C inkubiert und anschließend 4 µl des Dig High-Prime Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Ansatz mit TE-Puffer auf ein Volumen von 100 µl gebracht und über das QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Hälfte eines solchen Ansatzes wurde in 25 µl Prähybridisierungs-Lösung aufgenommen und als Sonde verwendet.

2.2.13 Anlegen von Klonbanken

Kolonien erfolgreich transformierter Zellen wurden von den Agarplatten gepickt und in - mit 150 µl LB-Medium und entsprechendem Antibiotika beschickte - Löcher einer 96 well Platte überführt. Nach einer Wachstumsphase von 12 h bei 37°C wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.14 Testen von Klonbanken

Um zu überprüfen, ob die Klone einer Klonbank das gewünschte DNA Fragment trugen, wurde die Hybridisierungstechnik angewendet. Diese beruht auf dem Prinzip, bestimmte konservierte Sequenzen mittels einer markierten DNA-Sonde mit der komplementären Sequenz durch Hybridisierung beider Sequenzen zu detektieren. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Sondentypen verwendet. Zum einen wurden DNA-Oligonukleotid-Sonden verwendet. Hierbei handelt es sich um in der Regel nur wenige Nukleotide große einzelsträngige DNA Fragmente, welche an ihrem 5'-Ende ein mit Digoxigenin markiertes Nukleotid aufwiesen. Zum anderen wurden Gensonden verwendet. Diese sind in der Regel längere, doppelsträngige DNA Fragmente, welche entweder endständig oder aber auch an mehreren Stellen mit Digoxigenin markierten Nukleotiden versehen waren.

Die zu hybridisierenden Klone wurden auf die Nylonmembranen mit einem Durchmesser von 80 mm (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig), welche auf, mit einem entsprechenden Antibiotikum versehenen Agarplatten aufgebracht wurden, gespottet und für 24 bis 48 h bei 37°C inkubiert. Hierauf wurden die Membranen von den Agarplatten genommen und auf einen 3 ml Tropfen Denaturierungslösung gelegt. Hierdurch kam es zu einer Lyse der Zellen, und die DNA Stränge wurden einzelsträngig. Nach einer Inkubation von 8 min wurde die Membran auf einen 3 ml Tropfen Neutralisierungslösung gegeben und für 5 min inkubiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Hiernach erfolgte eine mechanische Entfernung der Zellmasse in 2 × SSC Puffer. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und die DNA durch eine UV-Bestrahlung mit 40 J/cm² kovalent an die Membran gebunden.

Vor der Hybridisierung mit den entsprechenden Sonden wurden die Membranen für eine Stunde bei der später verwendeten Hybridisierungstemperatur unter leichtem Schwenken in Prehybridisierungslösung inkubiert. Hierbei wurden je nach Sondentyp unterschiedliche Prehybridisierungslösungen verwendet. Durch diesen Schritt wurde unspezifisches Binden der Sonde verhindert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte bei der sondenspezifischen Temperatur für mindestens 12 h unter leichtem Schwenken. Hierauf wurden die Membranen gewaschen. Membranen, die mit Gensonden hybridisiert wurden, wurden 2 mal 15 min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur in 2 × SSC und 0,1% SDS gewaschen, mit Oligonukleotidsonden hybridisierte Membranen 5 mal 5 min in eiskaltem 3 × SET und 0,1% SDS auf Eis gewaschen.

Der kolorimetrische Nachweis der Sonde erfolgte über eine, an einen Digoxigeninspezifischen Antikörper gebundene, alkalische Phosphatase, welche 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat und Nitroblau Tetrazoliumsalz in ein Indigo/Diazoniumsalz umsetzt, das als blauviolettes Präzipitat sichtbar wird. Hierzu wurde die Membran für 5 bis 30 min in DIG-P1

Puffer unter Schütteln bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindestellen durch eine 30 min Inkubation in Dig-P2 Puffer. Im nächsten Schritt wurde die Membran in DIG-P2 Puffer inkubiert, der mit Antikörper Anti-Digoxygenin-AP-Fab-Fragment in einer 5000fachen Verdünnung versehen war, für 30 min inkubiert. Nach einer anschließenden zwei mal 15 min Inkubation in DIP-P1 Puffer wurde die Membran kurz in DIG-P3 umgepuffert, bevor die Farbreaktion mit DIG-Färbelösung im Dunkeln durchgeführt wurde. Die Länge der Inkubation variierte zwischen 10 min und mehreren Stunden. Die Färbung wurde durch H₂O gestoppt.

2.2.15 Southernblot

Zum Transfer von DNA, welche auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde auf eine Nylonmembran, wurde das Gel zunächst für 2 mal 20 min in Denaturierungslösung inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation für 2 mal 20 min in Neutralisationslösung wurde der Blott wie in Abb. 2 beschrieben aufgebaut.

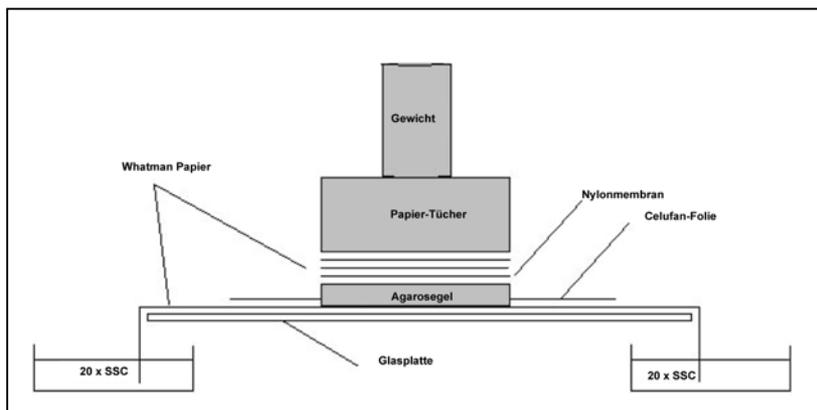


Abb. 2: Aufbau des Southernblotts.

Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Membran getrocknet und die DNA durch eine UV-Bestrahlung mit 40 J/cm² kovalent an die Membran gebunden. Die Hybridisierung mit der Sonde und der anschließende kolometrische Nachweis wurden wie unter 2.2.14 beschrieben durchgeführt.

2.2.16 Sequenzierung

Die Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe des "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) durchgeführt. Das Prinzip hierbei beruht auf einer Replikation der durch Hitze denaturierten DNA, bei der es durch den Einbau eines Didesoxynukleosid-Triphosphates auf Grund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem Kettenabbruch kommt. Die verwendeten Primer waren an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Durch das

Material und Methoden

gewählte Verhältnis von dNTP's zu ddNTP's wurde gewährleistet, dass es an jeder Stelle der zu sequenzierenden DNA mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu einem Kettenabbruch durch Einbau eines ddNTP's kommt. Die bei einer solchen Replikation entstandenen unterschiedlich langen Fragmente wurden auf einem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Hierbei wurde der "Alf-Express DNA Sequencer" (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Als Gel wurde das aus Komponenten (Polyacrylamid + UV-Sensitizer) bestehende ReproGel™ (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) verwendet. Als Laufpuffer diente 0,6 × TBE-Puffer. Das Gel wurde auf 55°C vorgeheizt und nach dem Laden der Proben in bei 55°C und 25W für 1000 min laufen gelassen.

Alternativ wurden Proben zur Sequenzierung an die Firma Qiagen (Hilden) geschickt. Hierbei wurden die Proben nach Angaben der Firma Qiagen vorbereitet.

Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Sequenzierprimer

Name	Sequenz 5' – 3'	Modifikation	Literatur
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	5' Cy5	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	5' Cy5	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
530fmC	CTACGTGCCAGCMGCCGCGG	5' Cy5	(Hurek, Wagner und Reinhold-Hurek 1997)

2.2.17 RT-PCR und PCR

In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich mit Umweltproben gearbeitet. Da hierbei die Gefahr von Kontaminationen extrem hoch ist, wurden alle in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs und PCRs mit Hilfe des Ready to Go RT-PCR beads kits (Amersham) durchgeführt. Hierbei sind bis auf das Wasser, das Template und die Primer alle nötigen Komponenten in Form einer lyophilisierten Kugel vorhanden. Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Hierdurch herrschten folgende Bedingungen: 2 Units *Taq*-DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM von jedem dNTP, FPLC gereinigte Reverse Transkriptase vom Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV), RNAGuard™ Ribonuklease Inhibitor und Stabilisatoren wie z.B. BSA. Für den Reverse Transkriptase (RT) Schritt wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µM der RT-Primer zugegeben und der Ansatz wahlweise bei 42°C für 40 min bzw. bei 47°C für 20 min inkubiert. Für die anschließende PCR wurden die beiden PCR-Primer bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µM zugegeben und der Ansatz, soweit nicht anders angegeben, nach folgender Programmstruktur inkubiert:

1. 2 min 95°C (optional)
2. 1 min 95°C
3. 2 min bei der entsprechenden Annealing Temperatur
4. 2 min 72°C

Material und Methoden

Die Schritte 2. bis 4. wurden zwischen 20 und 40 mal wiederholt. Abschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 72°C und eine Lagerung der PCR-Produkte bei 4°C bis zur weiteren Verwendung. Die PCRs wurden wahlweise (entsprechend der optimierten PCR) in verschiedenen Thermocycler Typen wie Progene (Techne, Cambridge, England), T-Gradient (Biometra, Göttingen) oder im Primus (MWG-Biotech, Ebersberg) durchführt.

Tabelle 2: Verwendete RT und PCR Primer

Name	Sequenz 5' – 3'	Modifikation	Ziel Gen	Position*	Literatur
104f	GGCGAACGGGTGMGTAAAYGCACTGG		16S	104 - 128	
1224r(Archaea)	TTCGGGGCATNCNGACCT		16S	1207 - 1224	<i>Diese Arbeit</i>
1224f(Archaea)	AGGTCNGNATGCCCGAA		16S	1207 - 1224	<i>Diese Arbeit</i>
1338f	CNTGAAGNNGGANTYGSTAGTAA		16S	1338 - 1360	<i>Diese Arbeit</i>
1338f_Cy5	CNTGAAGNNGGANTYGSTAGTAA	5' Cy5	16S	1338 - 1360	<i>Diese Arbeit</i>
1346r	TAGCGATTCCGACTTCA		16S	1340 - 1356	
1392r	ACGGGCGGTGTGTRC		16S	1402 - 1415	(Nubel <i>et al.</i> 1996)
1401r	CGGTGTGTACAAGACCC		16S	1395 - 1411	(Nubel <i>et al.</i> 1996)
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		16S	1501 - 1522	(Hurek <i>et al.</i> 1997)
1501f(Archaea)	AAGTCGTAACAAGTRRCCGT		16S	1501 - 1521	<i>Diese Arbeit</i>
1501r	TANNNTACCTTGTTACGACTT		16S	1501 - 1522	<i>Diese Arbeit</i>
25f	AACTKAAGAGTTTGATCCTGGCTC		16S	2 - 25	(Hurek <i>et al.</i> 1997)
334f	CCNNACTCCTACGGGAG		16S	334 - 350	<i>Diese Arbeit</i>
342f_Cy5	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	5' Cy5	16S	339 - 358	
926f(Archaea)	CTTAAAGRAATTGGCGGGGG		16S	921 - 940	
926r	YCCGTC AATTCTTTRAGTT		16S	919 - 939	
Gen457	CNTTCNNTCACNNTACT		23S	458 - 474	
LD-Bact_new	NYGGGTTNCCCATTCGG		23S	115 - 132	<i>Diese Arbeit</i>
LD-Bact_new_Cy5	NYGGGTTNCCCATTCGG	5' Cy5	23S	115 - 132	<i>Diese Arbeit</i>
L-D-Bact-132-a-A-18	CCGGGTTTCCCATTTCGG		23S	115 - 132	(Normand <i>et al.</i> 1996)
L-D-Bact-132-a-A-18_Cy5	CCGGGTTTCCCATTTCGG	5' Cy5	23S	115 - 132	(Normand <i>et al.</i> 1996)
S-D-Bact-1522-b-S-20	TGCGGCTGGATCCCCTCCTT		16S	1531- 1550	(Normand <i>et al.</i> 1996)
NIFHR-580	GTRYWDATVAKVCCVCCVAK		<i>nifH</i>	538 -558	(Hurek <i>et al.</i> 2002)
Zehr_nifH_forward	TGYGAYCCNAARGCNGA		<i>nifH</i>	115 - 131	(Zehr und McReynolds 1989)
Zehr_nifH_forward_Cy5	TGYGAYCCNAARGCNGA	5' Cy5	<i>nifH</i>	115 - 131	(Zehr und McReynolds 1989)
Zehr_nifH_reverse	ADNGCCATCATYTCNCC		<i>nifH</i>	460 - 476	(Zehr und McReynolds 1989)

*Referenzorganismus für die Bestimmung der Binde-Position der *Archaea* und *Bacteria* 16S und 23S rRNA Primer : *E. coli*.

*Referenzorganismus für die Bestimmung der Binde-Position der *nifH* Primer: *Klebsiella pneumoniae*

verwendete degenerierte Basen: D: A/G/T; K: G/T; M: A/C; N: A/C/G/T; R: A/G; S: C/G; V: A/C/G; W: A/T; Y : C/T

2.2.18 Phylogenetische Auswertung

2.2.18.1 *nifH* Sequenzen

Um die in dieser Arbeit isolierten *nifH* Sequenzen phylogenetisch einzuordnen, wurden zunächst sämtliche bis zum November 2002 in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) enthaltenen *nifH* Sequenzen heruntergeladen. Hierzu wurde die Datenbank mit folgenden Suchbegriffen durchsucht: *nifH*, *anfH* und *vnfH* und die gefundenen Sequenzen im FASTA Format abgespeichert. Sequenzen, welche degenerierte Basen in ihrer Sequenz aufwiesen, wurden entfernt. Mit Hilfe des Online Tools Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet 1988) wurde ein grobes Alignment der Sequenzen erstellt. Hierbei wurden die folgenden Parameter verwendet: Blosum62 Symbol Vergleichs Tabelle (Henikoff und Henikoff 1992), gap penalty at extremities (no penalty is charged for terminal gap). Dieses Alignment wurde in das Genedoc Programm (Nicholas und Nicholas 1997) importiert und auf die Positionen 115 bis 476 zurechtgeschnitten. Nach einer Übersetzung des Alignments in Proteinsequenzen wurde eine erneute Berechnung mit Hilfe des Programms ClustalX 1.83 (Thompson *et al.* 1997) durchgeführt. Hierbei wurde die Gonnet series protein weight matrix verwendet. Sequenzen, denen mehr als eine Aminosäure fehlten, wurden aus dem Alignment entfernt. Ebenso wurden von Sequenzen mit 99,7%iger Sequenzidentität auf DNA Ebene alle bis auf eine Sequenz aus dem Alignment entfernt.

Von dem so gewonnenen Alignment wurden durch manuellen Abgleich mit der NCBI Datenbank solche Sequenzen identifiziert, welche von kultivierten Organismen stammen. Diese wurden in ein eigenes Alignment überführt. Sequenzen, welche im Zuge dieser Arbeit neu identifiziert wurden, wurden in dieses Alignment importiert und von Hand aligned.

Die anschließende phylogenetische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001). Hierbei wurden folgende Parameter verwendet: Pairwise Deletion; Distance method: Amin: Poisson correction [Pairwise distance]; Tree marking method: Neighbor-joining.

2.2.18.2 16S rRNA Sequenzen

Sequenzen der 16S rRNA wurden phylogenetisch ausgewertet, indem sie in ein bestehendes Alignment importiert und dort manuell aligned wurden. Hierzu wurde das Genedoc Programm verwendet. Das Alignment umfasste die Positionen 103 bis 1356. Die anschließende phylogenetische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mega 2.1 Programms. Die verwendeten Parameter waren folgende: Gaps/Missing data: Pairwise Deletion; Codon Positions: Noncoding; Distance method: Nukleotide: Jukes-Cantor [Pairwise distance]; Tree marking method: Minimum evolution. No. Of Sites:1113; No Of Bootstrap Reps = 25.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung

3.1.1 Modifikation der RNA Extraktion nach Hurek (Hurek *et al.* 2002)

Die von Dr. Thomas Hurek beschriebene Methode, bei der es sich um eine modifizierte Version der von Chang (Chang, Puryear und Caine 1993) beschriebenen Extraktionsmethode handelt, ermöglichte es zum ersten mal große Mengen an *nifH* mRNA aus Pflanzenwurzeln zu extrahieren. Sie beruht auf einer mechanischen Zerstörung des Wurzelgewebes und einer anschließenden chemisch-enzymatischen Lyse der Bakterien. Die in dieser Methode verwendete chemisch-enzymatische Lyse der Bakterien stellt jedoch ein gewisses Risiko dar, da während dieses Prozesses weder RNase-inhibierenden Substanzen zugegen sind noch bei einer RNase-inhibierenden Temperatur (65°C) gearbeitet werden kann.

Um einen möglichen Abbau von RNA während der bakteriellen Lyse zu verhindern, wurde die oben beschriebene Methode abgewandelt. Statt der enzymatisch-chemischen, wurde eine physikalische Lyse mittels einer Zelmühle verwendet. Hierzu wurde das in flüssigem Stickstoff gemörserte Wurzelmaterial zunächst in 15 ml Extraktionspuffer aufgenommen und anschließend mit einem Glaspotter das Wurzelmaterial aufgebrochen. Im Anschluss daran wurde das Volumen mit Extraktionspuffer auf 20 ml erhöht und die Suspension in einen auf 65°C vorgewärmten Zelmühlenbecher überführt. Nach Zugabe von 4 g Glaskugeln (Ø150 µm) und 2 g Glaskugeln (Ø 1 mm) wurde die Probe für 4 min in der Zelmühle (Vibrogen 3, (Edmund Bühler, Tübingen)) bei 65°C gemahlen. Hiernach wurde die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert, so dass sich der gebildete Schaum absetzen konnte. Anschließend wurde die Probe auf Eis auf Raumtemperatur abgekühlt und ein Volumen Chloroform zugegeben. Die weiteren Schritte wurden wie unter 2.2.8.1 beschrieben durchgeführt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese modifizierte Methode als „Chang-Methode“ bezeichnet.

Zur Überprüfung der Extraktionseffizienz wurde von einer Wurzelprobe aus *Oryza longistaminata* Big Pot eine Extraktion durchgeführt. Von der gewonnenen RNA wurde eine MPN *nifH* RT-PCR (3.1.4) durchgeführt und die erhaltenen Werte mit denen früherer RNA Extraktionen aus der selben Pflanze verglichen.

Es konnte beobachtet werden, dass der *nifH* mRNA Level bei beiden Extraktionen nahezu identisch war.

Um sowohl eine Aussage über die *nifH*, als auch die 16S Diversität treffen zu können, ist es nötig, eine Co-Extraktion von bakterieller mRNA und 16S rRNA durchzuführen. Der Versuch, von einer, nach der modifizierten „Chang-Methode“ extrahierten RNA mittels RT-PCR ein

16S Fragment zu amplifizieren, schlug fehl. Weder in der unverdünnten Form, noch in zwei Verdünnungsschritten konnte eine Amplifikation beobachtet werden. Als RT-Primer wurde 1401r und als PCR-Primer 104f und 1346r verwendet. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1%igem Agarosegel. Um auszuschließen, dass es sich um eine Inhibition der RT-PCR durch co-extrahierte Bestandteile, wie zum Beispiel phenolische Substanzen handelt, wurde eine weitere RT-PCR durchgeführt, bei der ein Gemisch aus extrahierter RNA und Total-RNA von *Azoarcus* sp. BH72 als Template eingesetzt wurde. Als positive Kontrolle diente eine RT-PCR von reiner *Azoarcus* sp. BH72 RNA. Alle RT-PCRs wurden in drei Verdünnungsschritten angesetzt. Wie in Abb. 3 zu sehen, ist kein Unterschied zwischen dem Gemisch und der reinen RNA zu erkennen.

Hierauf wurden Modifikationen an der „Chang-Methode“ vorgenommen, um eine Co-Extraktion beider RNA Typen zu ermöglichen. Der Extraktionspuffer wurde ohne Mercapto-Propandiol angesetzt und auf 0,1 mg/ml Proteinase K eingestellt. Nach der Behandlung in der Zelmühle wurde die Probe für 15 min bei 65°C inkubiert und anschließend mit Mercapto-Propandiol versetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min bei 65°C, erfolgte das Abkühlen auf Raumtemperatur auf Eis und die Zugabe von einem Volumen Chloroform. Die weiteren Schritte folgten dem unter 2.2.8.1 angegebenen Protokoll.

Von der isolierten RNA wurde wieder eine 16S rRNA basierten RT-PCR mit oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Dieses mal konnte in allen drei Verdünnungen eine Amplifikation beobachtet werden.

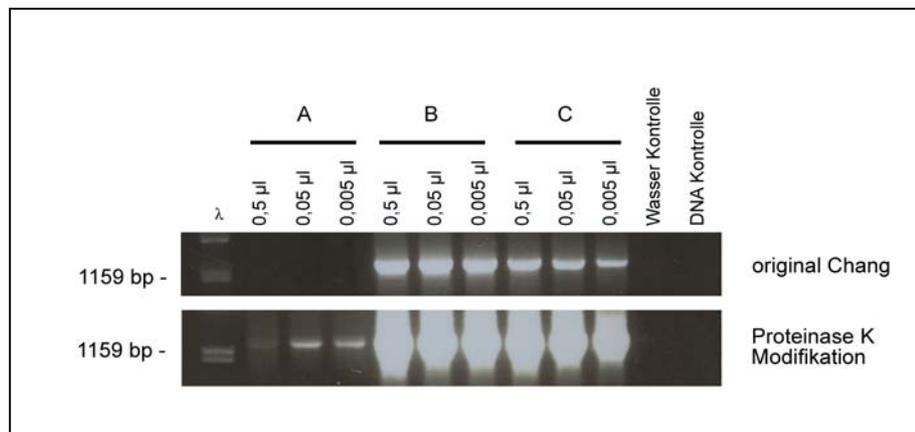


Abb. 3: Amplifikation von 16S rRNA mittels RT-PCR von RNA aus *O. longistaminata* vor und nach Modifikation der Methode. Auftrennung auf einem 1%igem Agarosegel. A. RNA aus Wurzelextraktion. B. Gemisch aus Wurzelextraktion und *Azoarcus* sp. BH72 total RNA. C. reine *Azoarcus* sp. BH72 total RNA. Als Längenstandart diente mit *Pst*I verdauete Lambda DNA (λ).

3.1.2 Optimierung verschiedener RNA Isolationsmethoden

Allgemein wird die Güte einer RNA Extraktion anhand des Verhältnisses der beiden Banden der zwei großen ribosomalen Untereinheiten (18S/28S bzw. 16S/23S) beurteilt. Im Idealfall liegt das Verhältnis bei 2,7:1. Eine Überprüfung der RNA Qualität einer Chang Extraktion auf

Ergebnisse

diese Weise zeigte, dass keine der vier zu erwartenden Banden zu erkennen war (siehe Abb. 4). Die Überprüfung fand auf einem 3,5%igen denaturierenden Acrylamid Gel statt. Die Auswertung erfolgte nach einer Färbung mit Ethidiumbromid am Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, part of Amersham Pharmacia Biotech). Hierbei wurden die unter 2.2.7.2 beschriebenen Einstellungen verwendet.

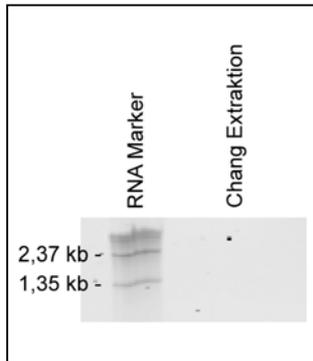


Abb. 4: Überprüfung der RNA Qualität einer Chang Extraktion aus einer *O. longistaminata* Wurzel Probe. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandard diente die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Als nächstes wurde überprüft, wie stabil RNA im Chang Extraktionspuffer ist. Hierzu wurde Bakterielle RNA von *Azoarcus* sp. BH72 unter unterschiedlichen Bedingungen im Extraktionspuffer inkubiert. Die Versuche wurden in einem 30 µl Ansatz durchgeführt. Jedem Ansatz wurden ca. 300 µg RNA zugegeben und die Konzentration der Pronase E bzw. Proteinase K auf 1 µg/µl eingestellt. Um Umweltbedingungen zu simulieren, wurde jeder Ansatz mit 0,05 µg RNase versetzt. Die Inkubation bei Raumtemperatur bzw. 65°C erfolgte für 15 min. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel aufgetragen. Als positive Kontrolle diente unbehandelte RNA. Wie in Abb. 5 zu erkennen, kam es zu einem starken Abbau der RNA im Extraktionspuffer. Am stärksten war die große ribosomale Untereinheit betroffen. Bei einer Inkubation bei Raumtemperatur war nur noch eine schwache Bande zu erkennen. Bei einer Inkubation bei 65°C lag sie unterhalb der Nachweisgrenze.

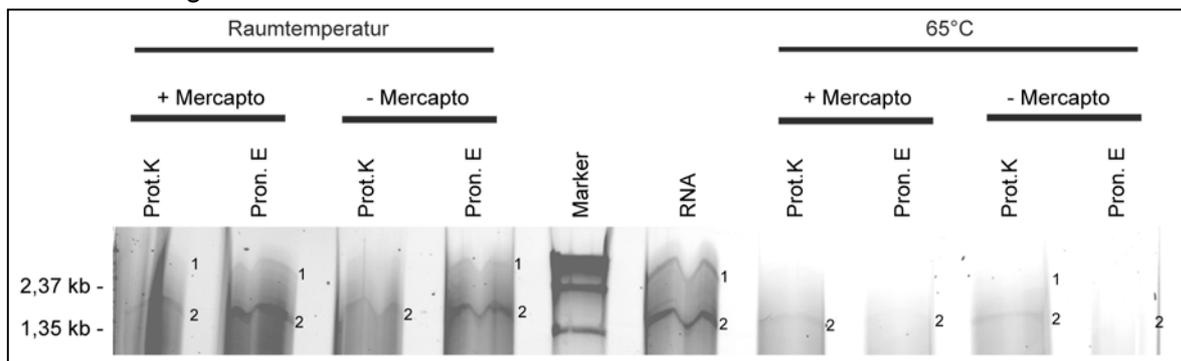


Abb. 5: Stabilität von *Azoarcus* sp. BH72 RNA im Extraktionspuffer. Es wurden 2 verschiedene Inkubations-Temperaturen (Raumtemperatur und 65°C) verwendet. Die Inkubation erfolgte mit (+ Mercapto) und ohne (- Mercapto) Zusatz von Mercaptopropandiol und unter Zugabe von entweder 1 µg/µl Proteinase K (Prot.K) oder 1 µg/µl Pronase E (Pron.E). Als Marker (M) diente die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). RNA bezeichnet die positive Kontrolle. Die beiden zu erwartenden Banden wurden mit 1 (23S rRNA) und 2 (16S rRNA) gekennzeichnet.

Ergebnisse

Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Methoden zur Extraktion von RNA auf die Qualität der extrahierten RNA hin untersucht. Zuerst wurde eine von Dr. Thomas Hurek modifizierte Hot Phenol Methode verwendet. Hierbei wurden 200 mg Wurzelfrischgewicht in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml 60°C warmem Hot-Phenol-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml ebenfalls 60°C warmes, mit 20 mM Na-Acetat pH 5,2 equilibriertes Phenol zugegeben und die Probe bei 60 °C für 5 min inkubiert. Hiernach wurde die Probe mit Hilfe eines Glaspotters aufgeschlossen und in ein Bio101 Biopulverizer Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Behandlung im Bio101 Biopulverizer für 3 x 20 sec. bei Stufe 6 wurde die Probe für 7 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Zur wässrigen Phase wurde erneut 1 ml 60°C warmes Phenol gegeben und die Probe für 5 min bei 60°C inkubiert. Nach einer Phasentrennung durch eine Zentrifugation von 10 min nach oben beschriebenen Bedingungen wurde dieser Schritt wiederholt. Darauf wurde die wässrige Phase mit 3 Volumen 96%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natrium Acetat (pH 5,2) versetzt und über Nacht bei -70°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 20 min wurde das Pellet 2 mal in 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl 60°C warmem Wasser resuspendiert und unmittelbar darauf mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohl (24:24:1) versetzt und vermischt. Nach der Phasentrennung durch eine Zentrifugation bei RT und 10.000 x g für 10 min wurde die wässrige Phase für 1h bei -20°C mit 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) gefällt, das Pellet nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C und 20.000 x g für 20 min 2 mal mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl 1 x RNAsecure aufgenommen. Die gewonnene RNA Lösung hatte eine tiefbraune Farbe. 1 µl der extrahierten RNA wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel aufgetragen (siehe Abb. 6 A).

Es ist zu erkennen, dass die beiden kleinen Untereinheiten 16S und 18S vorhanden sind. Die beiden großen Untereinheiten 23S und 28S hingegen sind nicht zu erkennen.

In einem nächsten Schritt wurde der pH-Wert des Phenols variiert. Es wurde ein niedrigerer pH (pH 4) und ein höherer pH (pH 8) gewählt. Von allen Extraktionen wurde je 1 µl der RNA auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel aufgetragen. Ein Vergleich aller drei Extraktionen (pH 4; 5,5 und 8) zeigte, dass bei einem pH von 5,5 (Abb. 6 A) die Konzentration der gewonnenen RNA am höchsten war. Bei einem pH von 4 (Abb. 6 B) wurde weniger RNA extrahiert, und die Verwendung von Phenol mit einem pH von 8 (Abb. 6 C) ergab eine Konzentration von RNA, die unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Als nächstes wurde auf die peqGold TriFast™ Methode (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) zurückgegriffen. Hierzu wurden 200 mg Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 1,5 ml Peq-Gold Lösung aufgenommen. Nach dem Aufschluss der Probe im Glaspotter wurden sie für 3 x 20 s bei Stufe 6 im Bio101

Ergebnisse

Biopulverizer behandelt. Die weitere Behandlung erfolgte nach Angaben des Herstellers. 1 µl der Extraktion wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel geladen. (Abb. 6 D.) Hier ist zu beobachten, dass bei dieser Extraktionsmethode hauptsächlich die 18S Bande zu erkennen ist. Die 16S Bande ist nur schwach vertreten, und die beiden Banden der großen Untereinheit liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

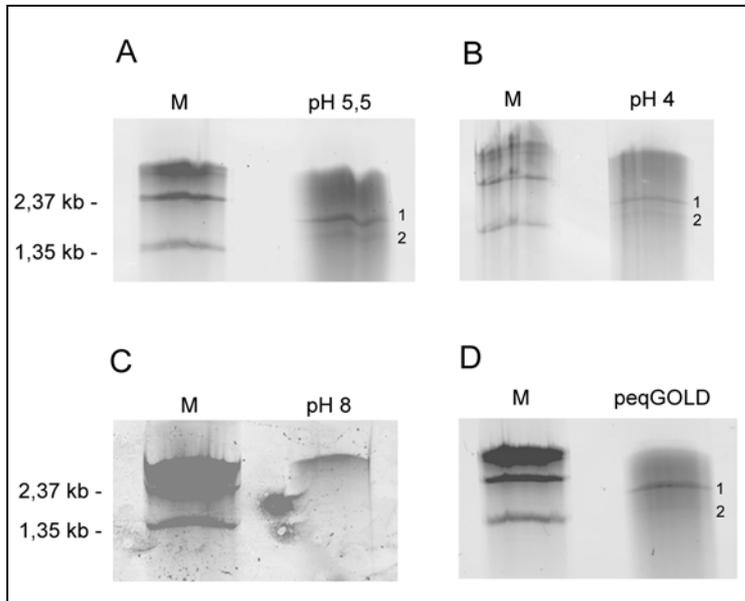


Abb. 6: Denaturierendes Polyacrylamid Gel von Hot Phenol Extraktionen mit verschiedenen pH-Werten und Peq Gold Extraktion. A. pH 5,2. B. pH 4. C. pH 8. D. Peq Gold. Als Marker (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Extraktionen A und B stammen aus *O. longistaminata* Namibia 2, die Extraktionen C und D aus *O. longistaminata* Big Pot. 1 markiert die 18S rRNA und 2 die 16S rRNA.

Um heraus zu finden, wie stabil RNA während des Extraktionsprozesses bleibt, wurde gesamt RNA von *Azoarcus* sp. BH72 dem Hot Phenol Puffer zugesetzt. In einer ersten Versuchsreihe wurde der Extraktionsverlauf ohne eine Wurzelprobe durchgeführt. Hierbei wurden zwei verschiedene Stufen bei der Behandlung der Probe im Bio101 Biopulverizer gewählt. Zum einen wurde die Probe für 3 x 20 s bei Level 4, zum anderen 3 x 20 s bei Level 6 behandelt. Von jeder Extraktion wurden je 1 µl auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle diente unbehandelte RNA von *Azoarcus* sp. BH72. Ein Vergleich der beiden unterschiedlichen Behandlungen zur unbehandelten RNA zeigt, wie in Abb. 7 zu erkennen, eine leichte Abnahme der RNA Bandenstärke nach der Extraktion. Diese war jedoch bei beiden verwendeten Einstellungen (Level 4 und Level 6) identisch. Bei der obersten Bande, welche die genomische DNA repräsentiert, konnte eine wesentlich stärkere Abnahme der Bandenstärke beobachtet werden. Hierbei war zu erkennen, dass die Abnahme der Bandenstärke bei einem Level von 6 während der Behandlung in der Bio101 Biopulverizer größer war als bei einem Level von 4.

Ergebnisse

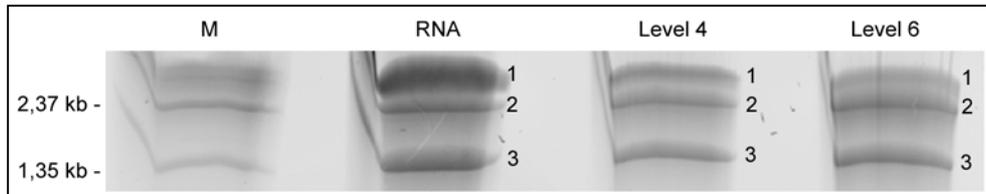


Abb. 7: Hot Phenol Extraktion mit Zusatz von total RNA von *Azoarcus* sp. BH72. RNA bezeichnet die positiv Kontrolle. Level 4 bzw. Level 6 bezeichnen die unterschiedliche Behandlung im Bio101 Biopulverizer. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). 1 = genomische DNA; 2 = 23S rRNA; 3 = 16S rRNA.

Als nächstes wurden zwei Extraktionen einer Wurzelprobe durchgeführt, wobei bei einer Extraktion total RNA von *Azoarcus* sp. BH72 dem Hot-Phenol Puffer zugemischt wurde. Wiederum wurden je 1 µl der Extraktion auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel geladen (Abb. 8).

Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Extraktion der Wurzelprobe alleine nur eine schwache 18S Bande erkennen lässt. Bei der Extraktion mit Zusatz von *Azoarcus* sp. BH72 total RNA konnte eine stärkere 16S und schwächere 18S und 23S Bande beobachtet werden. Ein Vergleich zu unbehandelter RNA zeigt jedoch eine starke Abnahme der Bandenstärke.

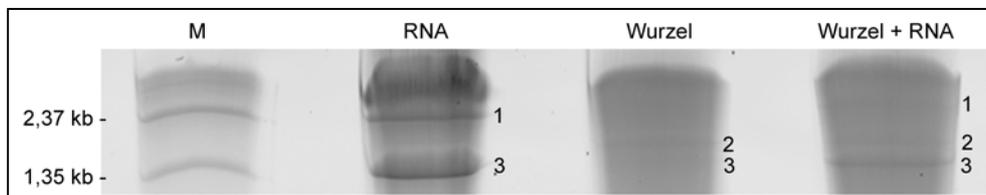


Abb. 8: Hot-Phenol Extraktion einer Wurzelprobe von *O. longistaminata* Namibia 2 mit (Wurzel + RNA) und ohne (Wurzel) Zusatz von total RNA von *Azoarcus* sp. BH72. RNA bezeichnet die positiv Kontrolle. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). 1 = 23S rRNA; 2 = 18S rRNA; 3 = 16S rRNA.

In einem nächsten Versuch wurde untersucht, wie sich eine Inkubation der Probe im mit Proteinase K versetzten Hot-Phenol-Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen auswirkt. Zum einen wurde die Probe für 10 min bei 37°C, zum anderen 10 min bei 65°C inkubiert. Zusätzlich wurde bei einer Probe das Phenol ohne vorherige Inkubation zugegeben. Der Auftrag je eines µl der Extraktion auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel zeigt, dass die 18S Bande bei der Probe, die nicht inkubiert wurde (Abb. 9), am stärksten ist. Die Bandenstärke der 18S in den beiden Inkubationen sind in etwa gleich stark. In allen drei Fällen konnte nur eine sehr schwache 16S Bande ausgemacht werden. Die beiden Banden der großen Untereinheiten waren nicht zu erkennen.

Ergebnisse

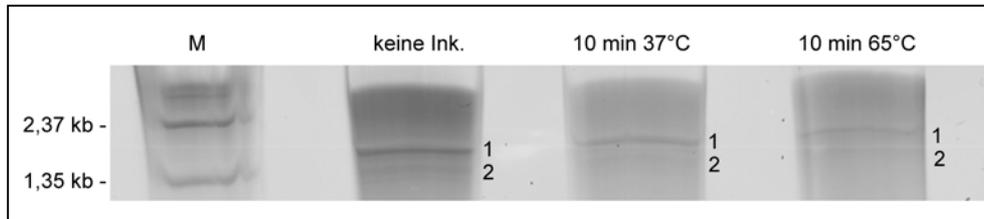


Abb. 9: Hot-Phenol Extraktion einer Wurzelprobe von *O. longistaminata* Namibia 2 mit unterschiedlicher Inkubation der Probe mit Proteinase K vor Zugabe des Phenols. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). 1 = 18S rRNA; 2 = 16S rRNA.

In einer erneuten Variation der Hot-Phenol Extraktion wurde die Menge an eingesetztem Hot-Phenol-Puffer und Phenol vervierfacht. Auch hier wurde 1 µl der Extraktion auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel geladen. Auf dem Gel (Abb. 10) ist eine schwache 16S und eine stärkere 18S Bande zu erkennen. Auch hier fehlen die beiden Banden der großen Untereinheiten.

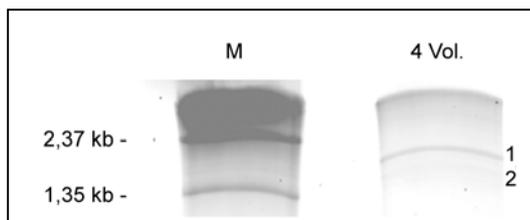


Abb. 10: Hot-Phenol-Extraktion einer Wurzelprobe von *O. longistaminata* Namibia 2 mit 4fachem Volumen an Hot-Phenol-Puffer und Phenol. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Die Auswirkung der Größe der eingesetzten Kugeln während der Behandlung in der Bio101 Biopulverizer wurde in einem nächsten Versuch untersucht. Es wurden die original Kugeln, sowie Kugeln mit einem Durchmesser von 0,1 mm und 1 mm verwendet. Der Versuch wurde in zwei Parallelen durchgeführt, wobei bei einer Durchführung die Phenolphase vor der Behandlung in der Bio101 Biopulverizer abgenommen und später wieder zugegeben wurde. Der Auftrag je eines µl der Extraktion auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel zeigt, dass sich die Bandenstärken, mit Ausnahme der Behandlung mit 1 mm Kugeln ohne Phenolphase kaum unterscheiden (Abb. 11)

Ergebnisse

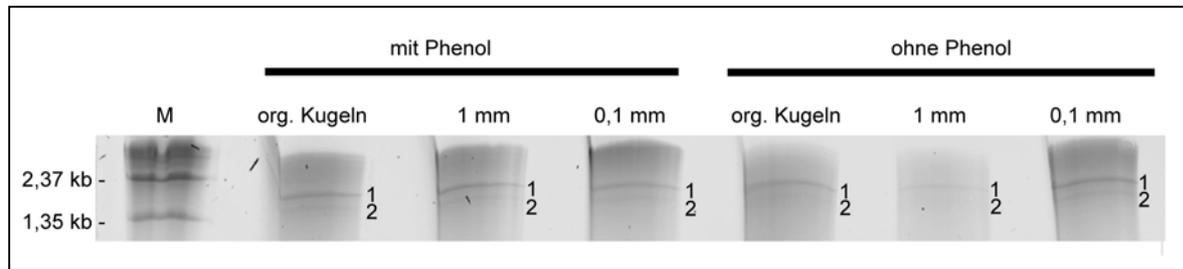


Abb. 11: Hot Phenol Extraktion einer Wurzelprobe von *O. longistaminata* Namibia 2 mit unterschiedlichen Kugeln während der Behandlung in der Bio101 Biopulverizer mit und ohne Phenolphase. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). 1 = 18S rRNA; 2 = 16S rRNA.

In einem nächsten Versuchsteil wurde die Temperatur während der Extraktion variiert. Hierbei wurde die Probe nach dem Mörsern in flüssigem Stickstoff zunächst in 4°C kaltem Hot-Phenol-Puffer und 4°C kaltem Phenol aufgenommen und auf Eis im Glaspotter aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Behandlung im Bio101 Biopulverizer. Hierbei wurde die Probe zwischen den einzelnen Behandlungen kurz auf Eis inkubiert, um eine Erwärmung zu verhindern. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 4°C wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 2 Volumen 98%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natrium-Acetat gefällt. Die übrig gebliebene Phenol-Phase wurde abgenommen und verworfen. Auf das Pellet wurden 800 µl Phenol und 800 µl Hot-Phenol-Puffer gegeben und dieses für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach einer Behandlung im Bio101 Biopulverizer für 3 x 20 s bei Stufe 5 erfolgte eine Phasentrennung durch eine Zentrifugation bei RT. Die wässrige Phase wurde ebenfalls wie oben beschrieben gefällt. Diese Methode wird im weiteren Verlauf als „Cold-Hot-Phenol-Methode“ bezeichnet. Eine Auftrennung von je einem µl der RNA Isolate auf einem denaturierenden Polyacrylamid Gel (Abb. 12) zeigt, dass bei der 4°C Extraktion nur die 16S und die 18S Bande zu erkennen sind, bei der 65°C Extraktion hingegen sind alle 4 Banden vertreten.

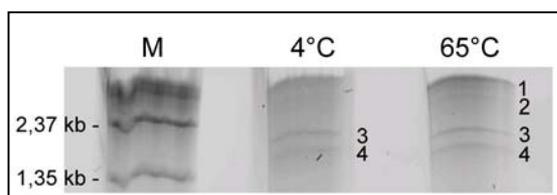


Abb. 12: RNA Qualität nach Extraktion mit der Cold-Hot-Phenol Extraktion einer Wurzelprobe von *O. rufipogon* 3D. A. Extraktion bei 4°C. B. Extraktion bei 65°C. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel. Als Längenstandart (M) diente die 0,24-9,5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). 1 = 28S rRNA; 2 = 23S rRNA; 3 = 18S rRNA; 4 = 16S rRNA.

Neben den Variationen der Hot-Phenol Methode wurden noch weiter publizierte Methoden zur RNA Extraktion ausprobiert. Die von Chen beschriebene Methode (Chen, Jin und Goodwin 2000) wurde wie folgt modifiziert: 200 mg wurden unter Zugabe von 250 µl Homogenisier-Puffers (4 M Guanidinium isothiocyanat; 100 mM Tris HCl, pH 7,0) in flüssigem Stickstoff gemörsert. Weiterhin wurde dem gefrorenen Homogenisat 90 mg NaCl

Ergebnisse

und 60 mg unlösliches Polyvenylpolypyrrolidon (PVPP) zugegeben und erneut in flüssigem Stickstoff gemörkert. Das Homogenisat wurde darauf hin in den Glaspotter überführt und 250 µl Extraktions-Puffer (2% CTAB; 1% lösliches PVP [K25]; 100 mM Tris-HCl, pH 7.0; 25 mM EDTA; 2,0 M NaCl) zugegeben. Nach einem weiteren Homogenisieren im Glaspotter wurde die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert, bevor sie in ein Bio101 Biopulverizer Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte eine Behandlung im Biopulverizer für 3 x 20 s bei Stufe 5. Hiernach wurde die Probe auf RT herabgekühlt, mit einem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzt und gut vermischt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 25 min wurde der wässrige Überstand erneut mit einem Volumen Phenol-Chloroform(1:1) extrahiert, erneut zentrifugiert (s.o.) und der wässrige Überstand mit einem Volumen Chloroform erneut extrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand mit ¼ Volumen 10 M Lithiumchlorid versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Hierauf wurde die Probe für 30 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde 2 mal mit einer 2 M Lithiumchlorid-Lösung und einmal in 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugationen jeweils bei 4°C und 12.000 x g für 15 min) und nach dem Trocknen in 20 µl RNasecure aufgenommen.

In einer leichten Abwandlung des oben beschriebenen Protokolls wurde die Probe nach Zugabe des Extraktionspuffers und der Inkubation für 10 min bei 65°C auf Raumtemperatur heruntergekühlt und mit einem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzt. Nach einer weiteren Homogenisierung im Glaspotter wurde die Probe in ein Bio101 Biopulverizer Reaktionsgefäß überführt und für 3 x 20 s bei Stufe 5 im Biopulverizer behandelt. Darauf folgte die Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 25 min. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Eine weitere Methode zur RNA Isolation wurde getestet. Hierbei handelt es sich um eine leicht modifizierte Variante der von Salzman (Salzman *et al.* 1999) beschriebenen Methode. 200 mg Wurzelfrischgewicht wurden in flüssigem Stickstoff gemörkert und anschließend in 1,5 ml Extraktionspuffer (4 M Guanidinium Thiocyanat; 100 mM Tris HCl, pH 8.0; 25 mM Natriumcitrat, pH 8,0 0,5% Laurylsacrosin; 10 mg Polyvenylpyrrolidone; 20µl/ml Mercaptopropandiol) aufgenommen und in einen Glaspotter überführt. Nach dem Aufschluss im Potter erfolgte ein weiterer im BIO101 Biopulverizer für 3 x 20 sec bei Stufe 5. Hiernach wurde 1 Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und die Probe 10-20 min geschüttelt. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei Salzman beschrieben. Zum Schluss wurde das Pellet in 20 µl RNasecure aufgenommen. Von den drei zuletzt beschriebenen Methoden wurde je 1 µl der Isolation auf ein denaturierendes Polyacrylamid Gel geladen. In jedem der drei Isolate lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abb. 13).

Ergebnisse

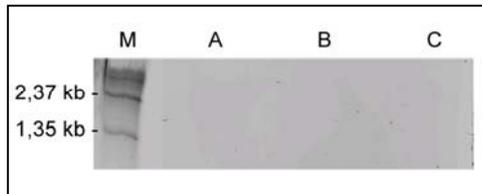


Abb. 13: Drei verschiedene RNA Isolationen aus einer Wurzelprobe von *O. rufipogon* 3D. A und B modifiziert nach Chen. C modifiziert nach Salzman. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass die Hot Phenol Methode die höchste Konzentration an RNA liefert. Bei dieser Methode waren die 16S und die 18S Banden am stärksten vertreten. Die beiden Banden der großen Untereinheiten waren jedoch nicht zu erkennen. Einzig die Modifikation der Hot Phenol Methode, bei der zuerst eine Extraktion bei 4°C und anschließend eine Extraktion bei 65°C durchgeführt wurde, zeigte in der letzten Extraktion alle 4 Banden der großen und kleinen Untereinheiten. Allerdings lag hier die Konzentration weit unterhalb der originalen Hot-Phenol Methode. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden oben genannten Methoden lag in der Färbung der RNA Lösungen. Bei der originalen Hot-Phenol Methode war die RNA Lösung tief braun gefärbt. Die Lösung der Cold-Hot-Phenol Extraktion wies bei der 4°C Extraktion auch eine tief braune Färbung auf, bei der 65°C Extraktion war die Braunfärbung jedoch nur sehr schwach.

Eine direkte Amplifikation von 16S Fragmenten war nur aus der 65°C Extraktion der Cold-Hot-Phenol Methode möglich. Bei der original Hot-Phenol Methode wurde die RNA zuvor über eine Säule mit einer G200 Matrix gereinigt. Ein Vergleich der RNA Qualität vor und nach der Aufreinigung zeigt eine Abnahme der Konzentration nach der Aufreinigung.

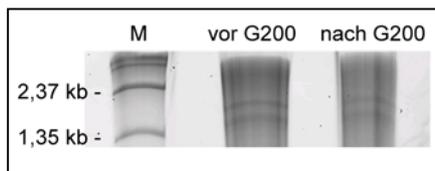


Abb. 14: Qualität der RNA einer Hot-Phenol Wurzelextraktion von *O. rufipogon* 3C vor und nach Aufreinigung über eine Sephadex G200 Säule. A. vor Aufreinigung. B. nach Aufreinigung. Die Auftrennung erfolgte auf einem 3,5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel. Als Längenstandart (M) diente die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Eine weitere Methode zur 16S Isolation besteht aus der Isolation der ribosomalen RNA aus Ribosomen. Hierzu wurde ein Protokoll modifiziert, welches von Felske (Felske *et al* 1996) entwickelt wurde, um 16S rRNA aus Bodenproben zu isolieren. Es wurden 2 g Wurzelfrischgewicht in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in einen 30 ml Zellhomogenisator Becher überführt. Der Probe wurden 4 g Glas Kugeln (\varnothing 150 μ m), 5 ml TPM Puffer (50 mM Tris-HCl (pH7,5); 1,7% Polyvinylpyrrolidone 25; 10 mM $MgCl_2$) und 250 μ l BSA (10% in TPM Puffer) zugegeben. Nach einer Behandlung der Probe im Zell Homogenisator (Vibrogen 3, (Edmund Bühler, Tübingen)) für 90 s bei 4°C wurde die Probe in

Ergebnisse

ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml TPM Puffer aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte bei 15.000 x g und 2°C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 30.000 x g und 2°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Ultra-Zentrifugengefäß überführt, und es schloss sich eine Zentrifugation bei 100.000 x g und 2°C für 2 h an. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis in 495 µl TN150 Puffer (10 mM Tris HCl (pH 8); 150 mM NaCl) und 5 µl 200 mM Vanadyl Ribonukleosid Complex (VRC) unter Rühren für 30 min resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und auf dem Vortex-Schüttler vermischt. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 20.000 x g und 4 °C für 5 min wurde die wässrige Phase mit 2 Volumina Ethanol (96%) und 1/10 Volumen 3M Natrium Acetat (pH5,5) bei -70°C für 30 min gefällt. Nach Pelletierung der Nukleinsäuren durch eine Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 15 min wurde das Pellet 2 mal mit 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend in der Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl TMC Puffer (10 mM Tris HCl (pH7,5); 5 mM MgCl₂; 0,1 mM CsCl) resuspendiert und mit 5U RNase-free DNase) versetzt. Nach einer Inkubation für 15 min bei 37°C wurde die Probe mit 400 µl TN150 Puffer aufgefüllt und eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), wie oben beschrieben, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fällung der RNA unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben. Das Pellet wurde zum Schluss in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Hierauf wurden die RT-PCR Bedingungen ermittelt, mit denen es möglich war, von dieser Art der Extraktion ein Amplifikat der 16S RNA zu bekommen. Es wurden verschiedene Primerpaarungen untersucht. Als Template diente eine Extraktion aus *O. longistaminata* Big Pot. Die verschiedenen Primer Paarungen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die PCR Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, welches in Abb. 15 dargestellt ist. Als optimal erwies sich die Primerpaarung aus 1401r als RT-Primer und 104f und 1346r als nested PCR Primer. Bei den beiden Primerpaaren 1401r/984f/1346r und 1392r/104f/926r sind Banden in der Wasserkontrolle zu erkennen. Die Verwendung des Primerpaares 1392r/104f/1346r führte zu keiner Amplifikation. Die zu erwartenden Längen der PCR-Produkte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Primerpaare für die Amplifikation von 16S Fragmenten

	RT-Primer	PCR-Primer 1	PCR-Primer 2	Produktgröße*
1	1401r	104f	1346r	1242 bp
2	1401r	984f	1346r	365 bp
3	1392r	104f	926r	822 bp
4	1392r	104f	1346r	1242 bp

*bezogen auf die 16 rRNA Sequenz von *E. coli*

Ergebnisse

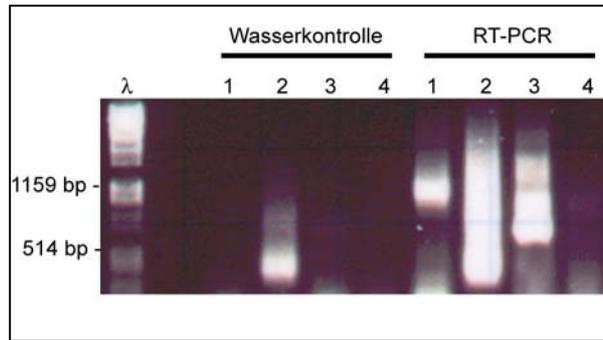


Abb. 15: Ermittlung der geeigneten Primerpaare für die Amplifikation von 16S rRNA aus einer Ribosomen Extraktion von *O. longistaminata* Big Pot. Die Nummerierung der Primerpaare richtet sich nach Tabelle 7. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel. Als Längenstandart diente mit *Pst*I verdauete DNA des Lambda Phagen (λ).

Bei der RT-PCR wurden zwei verschiedene Template Konzentrationen (140 ng und 5 ng) eingesetzt. Als RT-Primer wurde der 1401r Primer verwendet. Die anschließende PCR Amplifikation erfolgte mit dem Primerpaar 104f / 1346r. Das so gewonnene PCR Produkt wurde mit Hilfe des Topo-TA Cloning Kits kloniert. Mittels Blau-Weiß Screening wurden die Klone, welche ein Insert trugen, identifiziert und von diesen eine Klonbank angelegt. Diese Klonbank wurde mit Hilfe der 926f Sonde auf solche Klone hin getestet, welche ein 16S Fragment enthielten. Von diesen Klonen wurde das Plasmid isoliert und sequenziert. Die Sequenzen wurden in ein bestehendes Allignement von 16S Sequenzen eingefügt und von Hand aligned. Hierzu wurde das Programm GeneDoc v 2.6 verwendet. Anschließend wurde das Allignement im Fasta-Format exportiert. Mit Hilfe des Programms Mega Version 2.1 (Kumar *et al.* 2001) wurde das Fasta-File in ein Mega-File umgeschrieben und anschließend mit folgenden Parametern phylogenetisch ausgewertet: Gaps/Missing data: Pairwise Delition; Codon Positions: Noncoding; Distance method: Nukleotide: Jukes-Cantor [Pairwise distance]; Tree marking method: Minimum evolution. No. Of Sites:1113; No Of Bootstrap Reps = 25.

Abbildung 16 zeigt die phylogenetische Auswertung. Die Klone sind in zwei unterschiedlichen Farben (Violett = 5 ng Template; Grün = 140 ng Template) markiert. Es ist zu erkennen, dass bis auf einen Klon alle Klone, welche aus der 5 ng Template RT-PCR stammen, in die *Azoarcus* Gruppe fallen. In Abb. 17 ist diese Gruppe separat dargestellt. Hier lässt sich erkennen, dass bis auf eine Sequenz alle eng mit *Azovibrio restrictus* (AF011346) clustern.

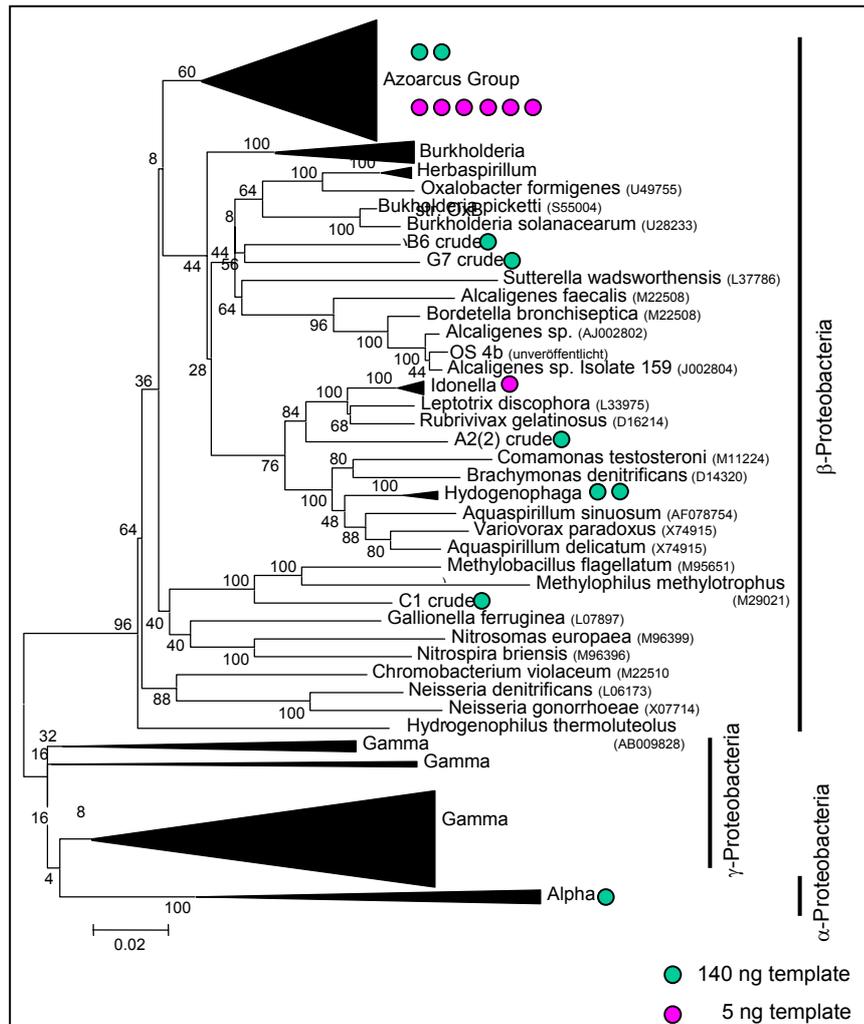


Abb. 16: Phylogenetische Auswertung der Klone, welche aus der Ribosomen Extraktions Methode gewonnen wurden. Die farblichen Markierungen zeigen die unterschiedlich eingesetzte Menge an Template bei der RT-PCR. Die Extraktion erfolgte aus einer Wurzelprobe von *O. longistaminata* Big Bot. Für den RT-Schritt wurde der 1401r Primer verwendet. Für die anschließende PCR kam das Primerpaar 104f / 1346r zum Einsatz. Die für die phylogenetische Auswertung verwendeten Sequenzen hatten eine Länge von 1113 bp.

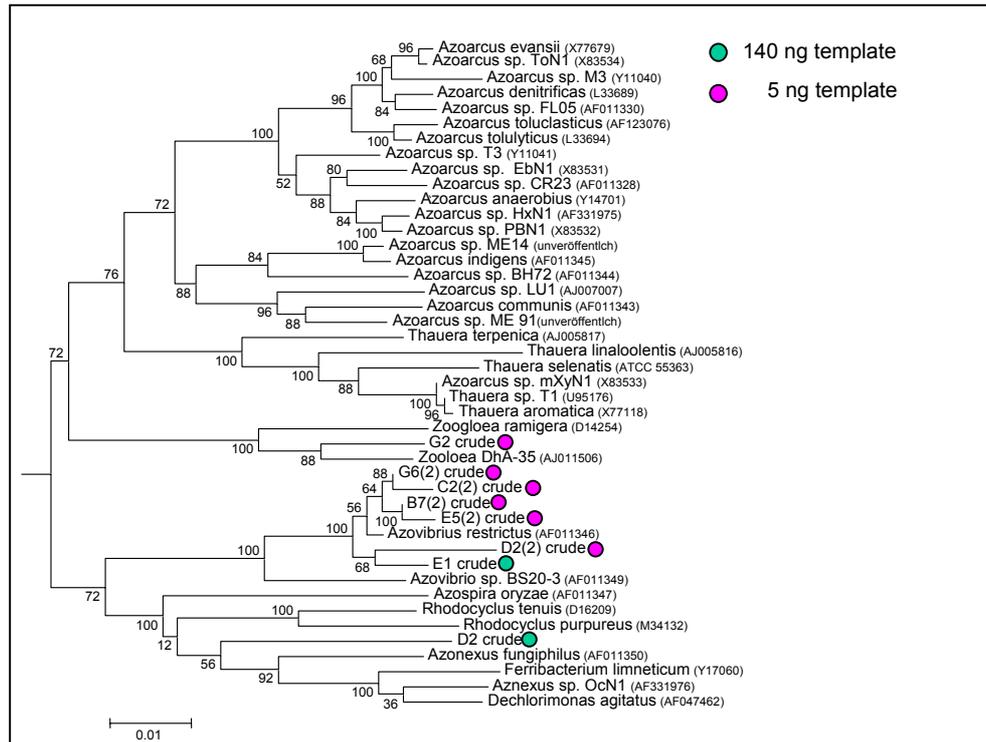


Abb. 17: Detailansicht der Azoarcus Gruppe aus Abb. 16.

Auffällig an diesen Ergebnissen war eine Limitierung der erhaltenen Sequenzen auf das Proteobakterien Cluster. Daher wurde im folgenden eine Überprüfung der eingesetzten Primer auf ihre Fähigkeit hin, möglichst das gesamte Spektrum der Bacteria zu amplifizieren, durchgeführt.

3.1.3 Primerdesign

Die Spezifität der in der Literatur publizierten 16S Primer wurde mit Hilfe der 16S Sequenz-Datenbank <http://greengenes.llnl.gov/16S/> (DeSantis *et al.* 2003) überprüft. Hierzu wurden die Primersequenzen mit Hilfe der Funktion „Probe“ gegen die Datenbank abgeglichen. In einem nächsten Schritt wurde mit Hilfe der auf der Webpage zur Verfügung gestellten Funktion „Slice“ überprüft, wie viele Sequenzen an der Primer-Bindestelle Sequenzinformationen enthalten. Dies war nötig, da es sich bei den in der Datenbank enthaltenen Sequenzen nicht nur um vollständige 16S Sequenzen handelt, sondern auch Teilsequenzen enthalten sind. Aus der Anzahl der Sequenzen mit Sequenzinformation an der Primer-Bindestelle konnte dann der Prozentsatz der mit dem Primer potentiell detektierten Sequenzen ermittelt werden.

Exemplarisch für zwei Primer, welche zur Amplifikation eines möglichst großen Fragmentes der 16S rRNA verwendet werden, wurde im folgenden eine Bestimmung der Prozentzahl der in der Datenbank vorhandenen komplementären Sequenzen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um folgende Primer: 25f und 1492r (Lane 1991; Hurek *et al.* 1997)

Ergebnisse

Für den Primer 25f konnten in der Datenbank 41 Sequenzen gefunden werden, welche an der Primer-Bindestelle eine komplementäre Sequenz aufwiesen. Eine Überprüfung mittels der „Slice“-Funktion ergab, dass 1100 Sequenzen in der 80781 Sequenzen umfassenden Datenbank an der Bindestelle Sequenzinformationen enthielten. Dieses ergibt einen Prozentsatz von 3,7%. Der Primer 1492r ist komplementär zu 7856 Sequenzen an der Primer-Bindestelle, und 17039 Sequenzen der Datenbank verfügen über Sequenzinformationen in diesem Bereich. Somit kommt man auf einen Wert von 46,1%. Für den oben verwendeten 16S rRNA Primer 104f konnte keine Sequenz in der Datenbank gefunden werden, welche zu 100% komplementär wäre. Erst ein Vernachlässigen der letzten 4 Positionen des Primers führte dazu, dass er 606 Sequenzen binden würde. Eine Überprüfung ergab, dass 50560 Sequenzen in der Datenbank an der Primer Bindestelle Sequenzinformationen enthalten, was bedeutet, dass der Prozentsatz der mit diesem Primer zu 100% komplementären Sequenzen bei 1,2% liegt. Eine nähere Betrachtung der 606 Sequenzen zeigte zudem, dass alle bis auf eine Sequenz in das Proteobakterien Cluster fallen.

Um neue, universellere Primer für die Amplifikation von 16S Gen-Fragmenten zu entwerfen, wurden zunächst publizierte Primer auf die oben beschriebene Weise auf ihre universelle Sequenz hin untersucht. Primer, die einen relativ hohen Prozentsatz (> 50%) an detektierten Sequenzen aufwiesen, wurde die Binde-Region mittels der „Slice“ Funktion im Fasta Format aus dem Alignment kopiert und in Microsoft® Word eingefügt. Da die Fasta Informationen vieler Sequenzen sehr lang und inhaltsreich waren, war ein direkter Import der Sequenzen in das Alignment Programm GeneDoc V. 2.6 (Nicholas und Nicholas 1997) nicht möglich. Daher wurde mit Hilfe eines Makros in Word die Fasta Information auf die Accession Nummer, sowie die von „Greengenes“ verwendete phylogentische Einteilung reduziert. Sequenzen ohne Accession Nummer, als auch solche, die von dem Makro nicht erfasst wurden, wurden manuell auf eine für GeneDoc akzeptable Form gebracht. Das so gewonnene Fasta Dokument wurde in GeneDoc importiert.

Mit Hilfe der „Find“ Funktion wurde im Alignment nach der Primer-Sequenz gesucht. Ein schrittweises Erhöhen der erlaubten „Mismatch“-Anzahl erlaubte eine Lokalisation der Positionen innerhalb des Primers, die durch degenerierte Basen ersetzt werden mussten, um eine größere Zahl an Sequenzen zu detektieren.

Anschließend wurden die so ermittelten Primer-Sequenzen erneut gegen die Datenbank von Greengenes abgeglichen.

Als Grundlage für neue 16S Primer diente zum einen der 1492r Primer, sowie eine auf der Internetseite des Max Plank Institutes für Marine Mikrobiologie publizierte Liste von

Ergebnisse

Sequenzen mit Sonden für die 16S rRNA von *Escherichia coli* (http://www.mpi-bremen.de/deutsch/moloek/sbehrens/E_coli_probe_table.pdf).

Für einen neuen forward Primer wurde der Eco334 Primer modifiziert. Für die beiden neuen reverse Primer diente zum einen der 1492r Primer, zum anderen der Eco1328 Primer als Grundlage. Die Spezifität der Primer vor und nach Modifikation ist in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Vergleich neue und alte 16S rDNA Primer für *Bacteria*.

Alter Name	Eco334	Eco1328	1492r
Seq. vor Mod.	CCAGACTCCTACGGGAG	AGCGATTCCGACTTCATG	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
Spez. vor Mod.	78,4%	85,2%	46,1%
Seq. nach Mod.	CCNNACTCCTACGGGAG	TTACTAGCGANTCCNNCTTCANG	TANNNTACCTTGTTACGACTT
Spez. n. Mod.	98,3%	96,2%	70,5%
Neuer Name	334f	1338r	1501r

Die oben beschriebene Spezifität der Primer gilt nur für *Bacteria*. *Archaea* werden durch diese Primer so gut wie nicht abgedeckt. Ein Design von Primern, welche beide Gruppen gleichzeitig amplifizieren war nicht möglich, da dieses den Einbau zu vieler degenerierter Basen bedeutet hätte. Daher wurden für die Gruppe der *Archaea* eigene Primer designed. Hierbei wurde jedoch nicht auf publizierte Primer zurückgegriffen, sondern anhand des von Greengenes bereitgestellte Alignments Bereiche ausgewählt, die eine sehr hohe Homologie aufwiesen. Diese Bereiche wurden dann, wie schon bei den *Bacteria* beschrieben, soweit mit degenerierten Basen versehen bis eine möglichst hohe Prozentzahl an *Archaea* abgedeckt wurde.

Die so erstellten Primer sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5: Spezifität und Sequenz neu erstellter 16S rDNA Primer für *Archaea*.

Name	926f(Archaea)	1224r(Archaea)	1501f(Archaea)
Sequenz	CTTAAAGRAATTGGCGGGGG	AGGTCNGNATGCCCGAA	AAGTCGTAACAAGGTRRCCGT
Spezifität	92,2%	89,9%	85,6%

Bei dem 926f_(Archaea) Primer handelt es sich um einen von Dr. Thomas Hurek zur Verfügung gestellten Primer. Dieses gilt auch für die beiden weiter unten aufgeführten 23S Primer Gen457 und 40r23S_(Archaea).

Zur Amplifikation der „Intergenic Spacer Region“ von *Bacteria* und *Archaea* wurden Primer benötigt, die in der 23S Region binden. Bei diesen Primern konnte nicht auf eine Internetbasierte Datenbank zurückgegriffen werden. Die Überprüfung der Spezifität erfolgte über ein von Dr. Thomas Hurek bereitgestelltes Alignment von 23S Sequenzen.

Es stellte sich heraus, dass der von Normand (Normand *et al.* 1996) publizierte Primer L-D-Bact-132-a-A-18 nur zu einem relativ geringen Anteil aller im Alignment vorhandenen Sequenzen zu 100% komplementär ist. Daher wurden diesem Primer an einigen Stellen

Ergebnisse

degenerierte Basen eingefügt. Die alte und die neue Sequenz des Primers sind in Tabelle 6 aufgeführt. Eine genaue Bestimmung der Prozentzahl an Sequenzen, die mit den 23S Primern detektiert werden, war nicht möglich, da das Programm GeneDoc keine Angaben über die Anzahl der gefundenen Sequenzen macht. Eine manuelle Auszählung war auf Grund der großen Anzahl der Sequenzen auch nicht möglich.

Tabelle 6: Modifikation IGS Primer

Alter Name	L-D-Bact-132-a-A-18
Seq. vor Mod.	CCGGGTTTCCCCATTCGG
Seq. nach Mod.	NYGGGTTNNCCCATTCGG
Neuer Name	L-D-Bact_neu

Da dieser Mangel erst erkannt wurde, als schon einige Versuche mit dem L-D-Bact-132-a-A-18 Primer durchgeführt worden waren, wurde überprüft, in wie weit sich die Bandenmuster von RISA PCRs mit dem alten und dem neuen Primer unterschieden. Hierbei wurde das Template von zwei unterschiedlichen Extraktionen (Chang original und Chang mit Proteinase K Schritt) von folgenden Pflanzenwurzeln verwendet: *Oryza rufipogon* 3c; Namibia 2 und *Oryza longistaminata* Big Pot. Alle PCR Produkte wurden auf 3,5%ige Polyacrylamidgele geladen und diese nach dem Lauf mit Ethidiumbromid gefärbt und mit Hilfe des Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, part of Amersham Pharmacia Biotech) eingescannt. Hierbei wurden die Standarteinstellungen verwendet.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass bei beiden verwendeten Primern die Bandenmuster identisch waren. Einzig die Intensität der Banden war bei dem original Primer stärker.

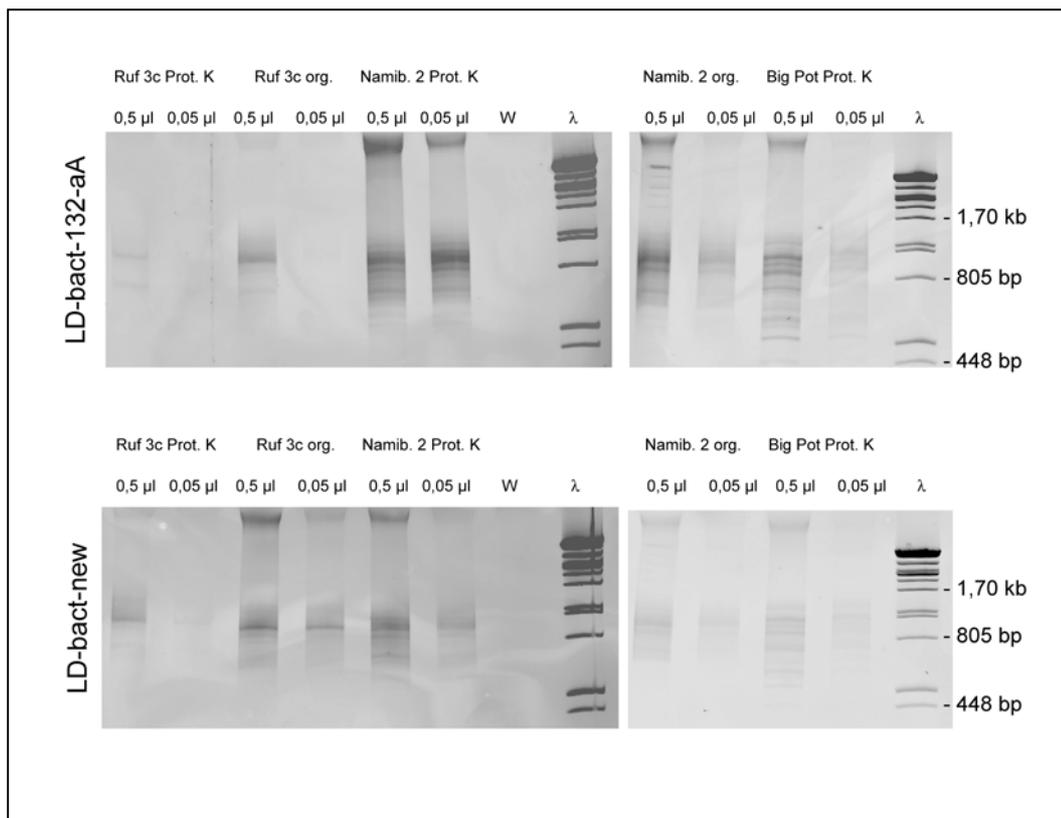


Abb. 18: Vergleich der Bandenmuster von RISA PCRs verschiedener Templates und Extraktionsmethoden mit LD-bact-132-aA und LD-bact-new Primer. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgele. Als Längenstandart diente mit *Pst*I Verdauete Lambda DNA (λ). Die dargestellten Banden des Markers erstrecken sich von einer Größe von 14 kb bis 448 bp. Ruf 3c = *O. rufipogon* 3c; Namib. 2 = *O. longistaminata* Namibia 2; Big Pot = *O. longistaminata* Big Pot. Das Template der PCRs stammte aus zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden: Der originalen Chang Methode (org.) und der Chang Methode mit zusätzlichem Proteinase K Schritt (Prot. K).

3.1.4 Kalibrierung der PCR und RT-PCR für most-probable-number (MPN) Berechnungen

Um abzuschätzen, wie groß die Population an stickstofffixierenden Bakterien in den untersuchten Pflanzenwurzeln war, wurde die MPN-RT-PCR bzw. MPN-PCR verwendet. Die Kalibrierung der RT-PCR erfolgte zum einen über eine Verdünnungsreihe von total RNA, welche aus einer stickstofffixierenden Kultur von *Azoarcus* sp. BH72 gewonnen wurde, zum anderen über invitro transkribierter *nifH* mRNA (zur Verfügung gestellt von Prof. Barbara Reinhold-Hurek und Dr. Thomas Hurek). Für die Kalibrierung der MPN-PCR wurde ein *nifH* DNA Fragment verwendet. Hierzu wurde ein Plasmid, welches das Zehr-Fragment des *nifH* Gens trug, in *E. coli* Zellen hochamplifiziert und nach einer Plasmidisolierung das *nifH* Fragment mittels Restriktionsverdau aus dem Plasmid geschnitten. Nach Auftrennung über ein 2%iges Agarosegel wurde das *nifH* Fragment aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des Qiagen Gel Elution Kits aus dem Gel aufgereinigt. Die so gewonnenen RNA bzw. DNA Fragmente wurden in mehreren 10er Verdünnungen als Template für eine RT-PCR bzw.

Ergebnisse

PCR verwendet. Die Bestimmung der Ausgangskonzentration der Templates erfolgte mit Hilfe des Picofluor Photometers. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über 2%ige mit Ethidiumbromid vorgefärbte Agarose Gele. Von jedem Template (total RNA, invitro mRNA und DNA) wurden mehrere Ansätze ausgewertet. Abb. 19 zeigt die Banden der RT-PCR bzw. PCR Reaktionen, welche auf einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Als positive wurden solche PCR Ansätze gewertet, von welchen auf dem Agarosegel noch eine gut sichtbare Bande zu erkennen war. Die Werte für alle Ansätze sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Ergebnisse der MPN RT-PCR und PCR

BH72 total RNA	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6
340 ng	+	+	+	+	+	+
34 ng	-	+	-	+	+	+
3,4 ng	-	-	-	-	-	-
340 pg	-	-	-	-	-	-

BH72 total RNA	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6
1200 ng	+	+	+	+	+	+
120 ng	-	+	+	+	+	+
12 ng	-	-	-	-	-	+
1,2 ng	-	-	-	-	-	-

in vitro <i>nifH</i> mRNA	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
1 ng	+	+	+	+	+
100 pg	+	+	+	+	+
10 pg	-	-	-	-	-

Zehr Fragment DNA	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
20 ng	+	+	+
200pg	+	+	+
2pg	+	+	+
20 fg	-	+	+
200 ag	-	-	-

+ = sichtbare Bande auf dem Agarosegel
 - = keine sichtbare Bande auf dem Agarosegel

Die statistische Auswertung erfolgte über das Programm MPN Calculator (Hurley und Roscoe 1983). Das Detektionslimit für die RT-PCR von *Azoarcus* sp. BH 72 total RNA lag bei 130 ± 114 ng, was einer Gesamtzahl von 3×10^7 Bakterien dieser Art entspricht. Da bei Untersuchungen an Wurzelmaterial sowohl das eingesetzte Gewicht, als auch das Gesamtvolumen, in welchem die extrahierte RNA aufgenommen wurde, bekannt war, konnte anhand des oben ermittelten Detektionslimits die Zahl der in der Wurzel vorhandenen stickstofffixierenden Bakterien pro Gramm Wuzeltrockengewicht ermittelt werden.

Die Nachweisgrenze bei der RT-PCR von invitrotranskribierter mRNA lag bei 43 pg und für die PCR des *nifH* Fragmentes konnte eine Nachweisgrenze von 37 fg ermittelt werden.

Ergebnisse

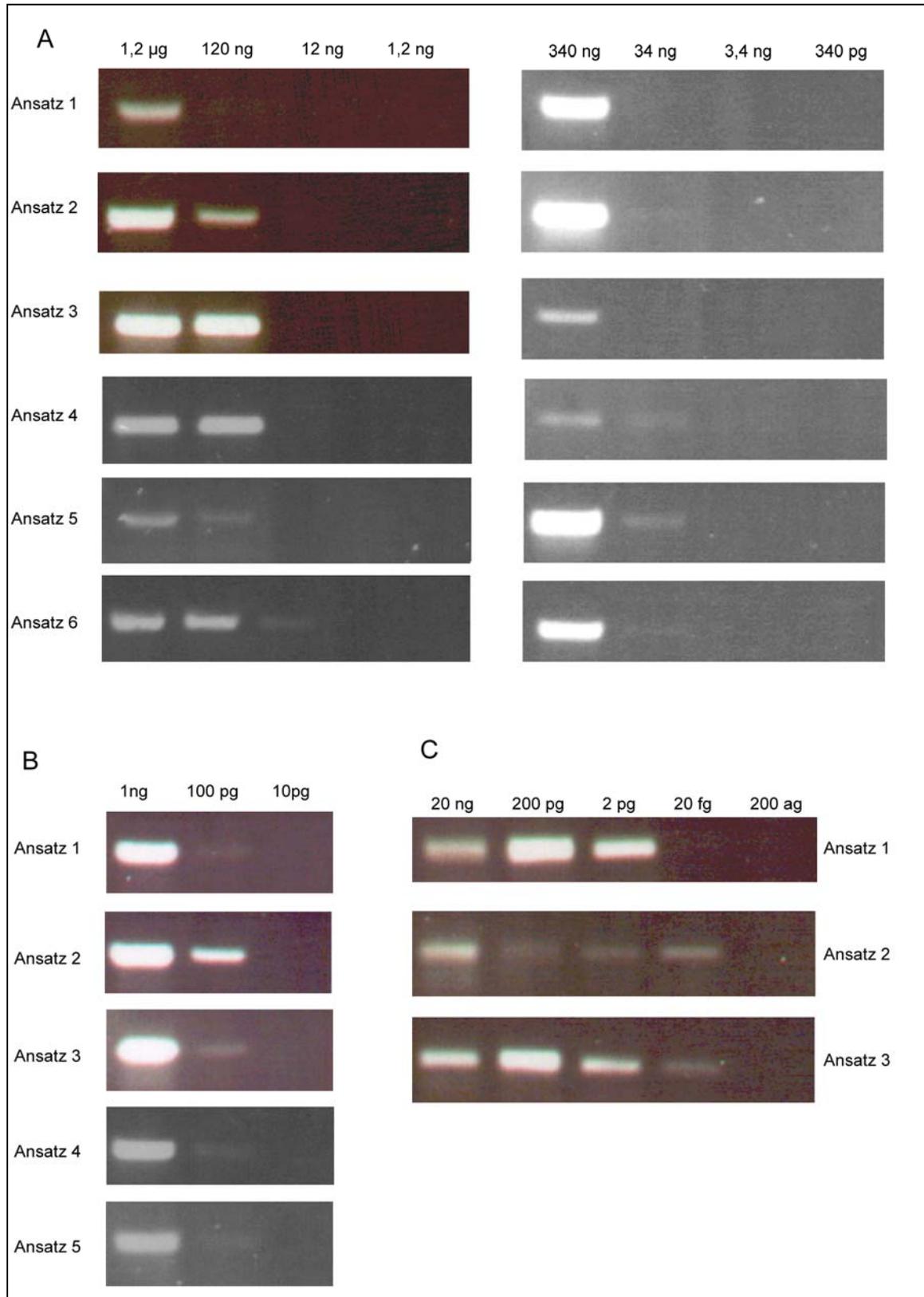


Abb. 19: MPN RT-PCR bzw. PCR. A. Verdünnungs-RT-PCR von total RNA einer stickstofffixierenden Kultur von *Azoarcus* sp. BH72. B. Verdünnungs-RT-PCR von invitrotranskribierter *Azoarcus* sp. BH72 *nifH* mRNA. C. Verdünnungs-PCR von *Azoarcus* sp. BH72 *nifH* DNA. In den Abbildungen der Gele ist jeweils nur die erste Verdünnung, welche in keinem der Ansätze eine Amplifikation ergab, aufgeführt. Ansätze mit ≤ 120 ng (A); ≤ 1 pg (B) und ≤ 20 ag (C) ergaben in keinem der Ansätze eine sichtbare Bande auf dem Agarosegel.

Ergebnisse

Da in früheren Versuchen keine vorgefärbten Gele verwendet wurden, wurde als nächstes untersucht, ob sich die Nachweisgrenze zwischen vorgefärbten und nicht-vorgefärbten Gelen unterscheidet. Hierzu wurde eine *nifH* RT-PCR auf beide Typen von Gelen aufgetragen und die Nachweisgrenzen miteinander verglichen. Als Template für die RT-PCR diente RNA, welche mittels der Chang-Methode aus einer *Oryza longistaminata* Pflanze von den Philippinen isoliert wurde. Es wurden 0,5 µl; 0,05 µl und 0,005 µl Template verwendet. Wie auf Abb. 20 zu erkennen, gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Geltypen.

Auf beiden Gelen sind Banden bis zur zweiten Verdünnung zu erkennen. Der einzige Unterschied lag in der Schärfe der dargestellten Banden.

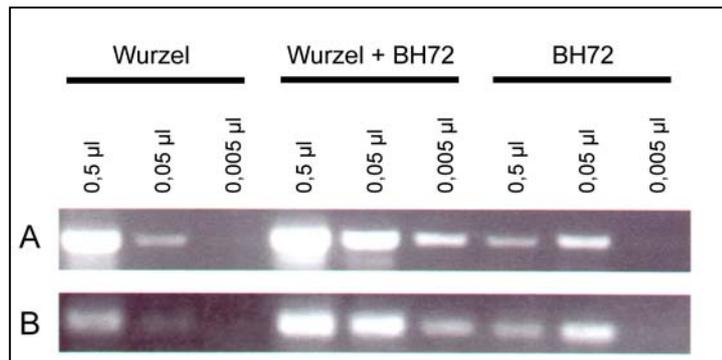


Abb. 20: Vergleich der Nachweisgrenze vorgefärbte und nicht vorgefärbte Agarosegelen. A. vorgefärbt. B. nicht vorgefärbt.

3.1.5 Modifikation der rRNA intergenic spacer analysis (RISA)

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde die rRNA intergenic spacer analysis (RISA) variiert. Hierbei handelt es sich um eine relativ einfache Methode, um eine mikrobielle Gemeinschaft auf ihre Diversität hin zu untersuchen. Sie macht sich zu nutzen, dass der Bereich zwischen der 16S und der 23S bei Bakterien unterschiedlich lang ist. Mittels PCR wird dieser Bereich amplifiziert und eine Auftrennung der PCR-Produkte gibt einen Einblick, wie divers eine mikrobielle Gemeinschaft ist. Jedoch kann auf diese Weise keine Aussage über die Zusammensetzung der Bakterienpopulation gemacht werden. Um neben der Information über die Diversität auch noch die in der Gemeinschaft vertretenen Bakterien zu charakterisieren, wurde die von Normand publizierte Methode (Normand *et al.* 1996) abgewandelt.

In einem ersten Schritt wurden die Bedingungen für eine PCR mit den original von Normand publizierten Primern SD-Bact-1522-bS und LD-Bact-132-aA ermittelt. Als Template diente eine Hot-Phenol Extraktion aus *Oryza longistaminata* aus dem Gewächshaus. Zuerst wurde die optimale Annealing Temperatur ermittelt. Hierzu wurde ein Gradienten PCR mit folgenden Annealing Temperaturen durchgeführt: 52,5°C; 55,8°C und 59°C. Das Template wurde unverdünnt und in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Wie in Abb. 21 zu erkennen, erwies sich eine Annealing Temperatur von ca. 52°C als optimal. Hier wurde die höchste Zahl an sichtbaren Banden erhalten.

Ergebnisse

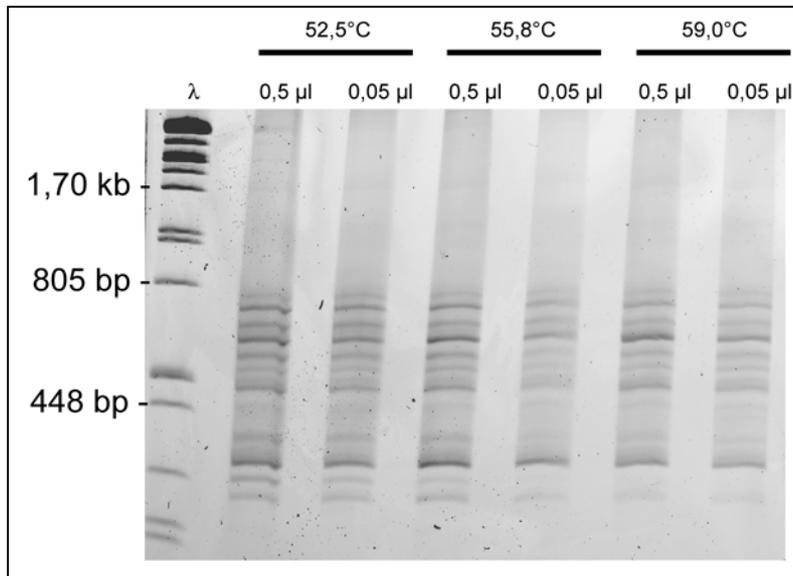


Abb. 21: Optimierung der Annealing Temperatur für die IGS PCR nach Normand. Als Template diente eine Hot Phenol Extraktion von *O. longistaminata* Big Pot. Es wurden zwei unterschiedlichen Mengen an Template für die PCR eingesetzt (0,5 µg und 0,05 µg). Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgel. Als Längenstandart diente mit *Pst*I Verdauter Lambda DNA (λ).

Um Informationen über die Bakterien zu bekommen, wurde nun ein neuer forward Primer gewählt, welcher weiter innerhalb der 16S Sequenz liegt. Hierbei handelt es sich um den unter 3.1.1 beschriebenen 1338f Primer. Um die optimalen Bedingungen für die PCR zu ermitteln, wurde hier ebenfalls eine Gradienten PCR durchgeführt. Folgende Temperaturen wurden verwendet: 50°C; 52°C; 56°C und 58°C. Zudem wurde die $MgCl_2$ Konzentration variiert. Zum einen wurde die original Konzentration von 1,5 mM verwendet, zum anderen wurde die Konzentration auf 4 mM erhöht. Wie in Abb. 22 zu erkennen, lag das Optimum bei einer Temperatur von 52°C und einer $MgCl_2$ Konzentration von 4 mM.

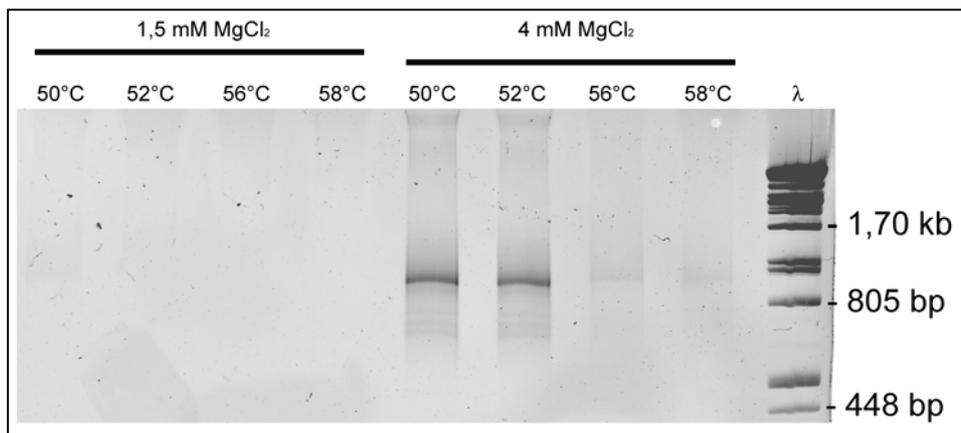


Abb. 22: Optimierung der PCR Bedingungen für die Primerpaarung 1338f und LD-bact-132-aA. Als Template diente eine Hot Phenol Extraktion von *O. longistaminata* Big Pot. Es wurden 4 verschiedene Annealing Temperaturen gewählt. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgelle. Als Längenstandart diente mit *Pst*I Verdauter Lambda DNA (λ).

Ergebnisse

Ein Vergleich der Bandenmuster von PCRs mit original und neuem Primer zeigt, dass beide PCRs das gleiche Muster liefern, welches bei zuletzt beschriebenen PCR nur um ca. 200 bp nach unten verschoben wurde.

Um die Diversität auch auf Expressionsebene zu erfassen, wurde versucht, eine RISA RT-PCR zu etablieren. Da das RNA Transkript sehr schnell nach der Transkription prozessiert wird und so nur in Größenordnungen vorliegt, wie etwa mRNA, muss bei der Amplifikation mit sehr hohen Zyklenzahlen gearbeitet werden. Wie in Abb. 23 zu erkennen, führte eine Amplifikation mit 25 Zyklen nur zu einem extrem schwachen Produkt. Erst mit 40 Zyklen konnten gut sichtbare Banden auf dem Acrylamidgel beobachtet werden. Zur Optimierung wurden zwei verschiedene Temperaturen für den Reverse Transkriptase Schritt verwendet. Dieser Schritt wurde zum einen mit 42°C, zum anderen bei 47°C jeweils für 40 min durchgeführt. Anschließend wurde von der so erzeugten cDNA pro Ansatz eine PCR mit 25 und eine PCR mit 40 Zyklen durchgeführt. Hierbei wurden die oben genannten Parameter für eine RISA PCR (4mM MgCl₂ und 52°C Annealing Temperatur) verwendet. Wie auf der Abbildung zu sehen, lagen die optimalen Bedingungen für eine RISA RT-PCR bei einer reversen Transkription bei 47°C für 40 min.

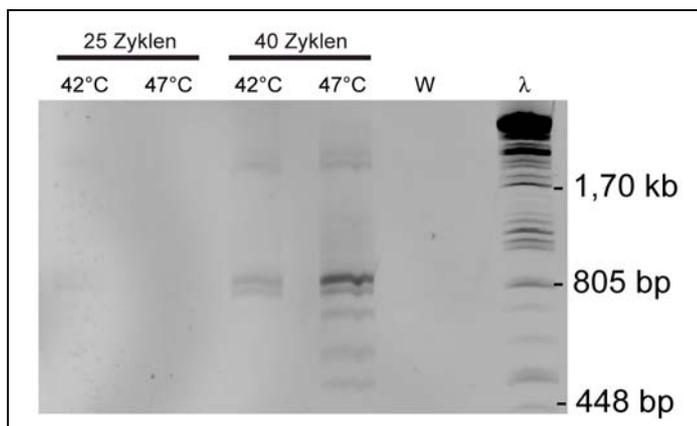


Abb. 23: Optimierung der RISA RT-PCR. Es wurden 2 unterschiedliche Zyklenzahlen (25 und 40 Zyklen) und 2 verschiedene Temperaturen für den Reverse Transkriptase Schritt (42°C und 47°C) verwendet. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgelle. Als Längenstandard diente mit *Pst*I Verdauter Lambda DNA (λ).

Die Verwendung von solch hohen Zyklenzahlen macht eine PCR-Reaktion sehr anfällig für Kontaminationen, wie sie auf Abb. 24 in der Wasserkontrolle zu erkennen ist. Wenn neben der hohen Zyklenzahl zudem noch Primerpaare verwendet werden, welche eine hohe Bindeaffinität zeigen, ist es extrem schwer, kontaminationsfrei zu arbeiten. Die hier beobachtete Doppelbande bei einer Größe von etwa 850 bp war bei allen späteren Versuchen in der Wasserkontrolle zu beobachten.

Ergebnisse

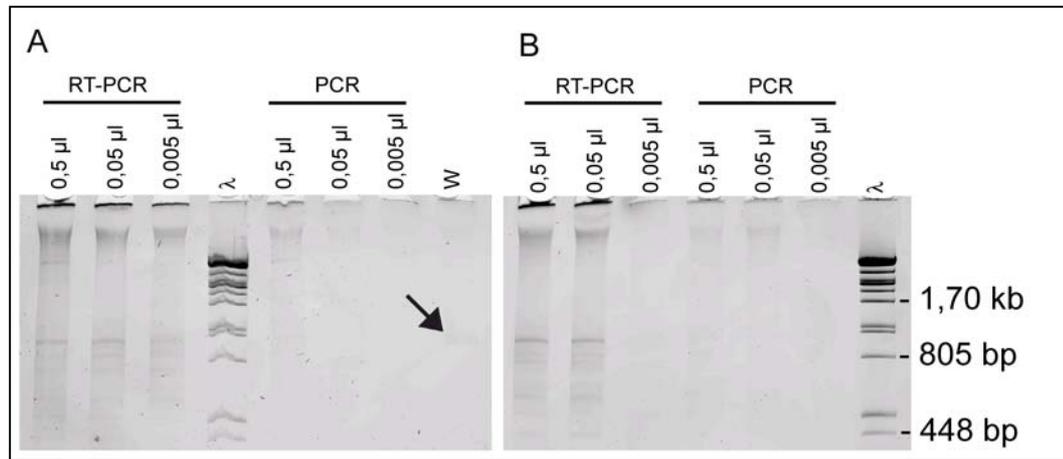


Abb. 24: Vergleich einer RISA RT_PCR von zwei unterschiedlichen Extraktionen aus Wurzelproben von *O. longistaminata*. Es wurden jeweils 3 10er Verdünnungen als Template verwendet. A. Chang Extraktion. B. Cold/Hot Phenol Extraktion. Die Wasserkontamination ist mit einem Pfeil markiert. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgele. Als Längenstandart diente mit *PstI* Verdauete Lambda DNA (λ).

Die Auftrennung auf einem 3,5%igen Minigel ist nicht sehr hoch. Um eine höhere Auflösung zu erreichen, wurde die RISA PCR mit einem forward primer durchgeführt, welcher an seinem 5'-Ende mit Cy5 markiert war und auf ein Polyacrylamid Gel geladen, wie es auch für Sequenzierungen (2.2.16) verwendet wird. Der einzige Unterschied hierbei war die Verwendung des ReproGel™ High Resolution Gels anstelle des sonst verwendeten ReproGel™ Longread. Die Bedingungen für den Lauf waren dieselben wie bei der Sequenzierung beschrieben. Als Test diente eine Re-Amplifikation zweier RISA RT-PCRs von *O. longistaminata*, welche zuvor von zwei unterschiedlichen Extraktionen (Hot-Phenol Extraktion und Chang Extraktion) durchgeführt wurde. Hierbei wurden je 1 µl der original PCR Reaktionen als Template eingesetzt. Die Reamplifikation wurde mit 25 Zyklen durchgeführt, und als Primer wurde 1338f-Cy5 verwendet. Als Marker diente zum einen der ALFexpress™ Sizer® 50-500 mit Fragmenten von 50 bp bis 500 bp in einem 50 bp Abstand, zum anderen ein eigens hergestellter Größenstandart aus PCR Produkten. Hierfür wurden mit verschiedenen Primerpaaren Fragmente der 16S DNA von *Azoarcus sp.* BH72 amplifiziert, wobei jeweils ein Primer an seinem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 versehen war. Tabelle 8 zeigt die Primerpaare mit den entsprechenden Längen der zu erwartenden PCR-Produkte.

Tabelle 8: Primerpaare mit zu erwartender Länge der PCR-Produkte

Forward Primer	Reverse Primer	PCR Produktlänge
Zehr_nifH_forward_Cy5	Zehr_nifH_reverse	360 bp
342f_Cy5	926r	584 bp
25f_Cy5	926r	801 bp
1338f_Cy5	LD-bact-132-aA	840 bp*
530fmc	1492r	890 bp

* PCR von einem 850 bp IGS Fragment aus *Ralstonia sp.*

Ergebnisse

Es ist zu erkennen, dass auf diese Weise eine weit höhere Auflösung erreicht wurde als auf dem Minigel (Abb. 24). Die Muster der Banden zwischen den beiden verschiedenen Extraktionsmethoden ist in diesem Fall relativ gleich, jedoch sind bei der Chang Extraktion zwei starke Banden bei 200 bp und 300 bp zu erkennen, die weder bei der Hot Phenol Extraktion, noch bei beiden original RISA RT-PCRs zu erkennen waren.

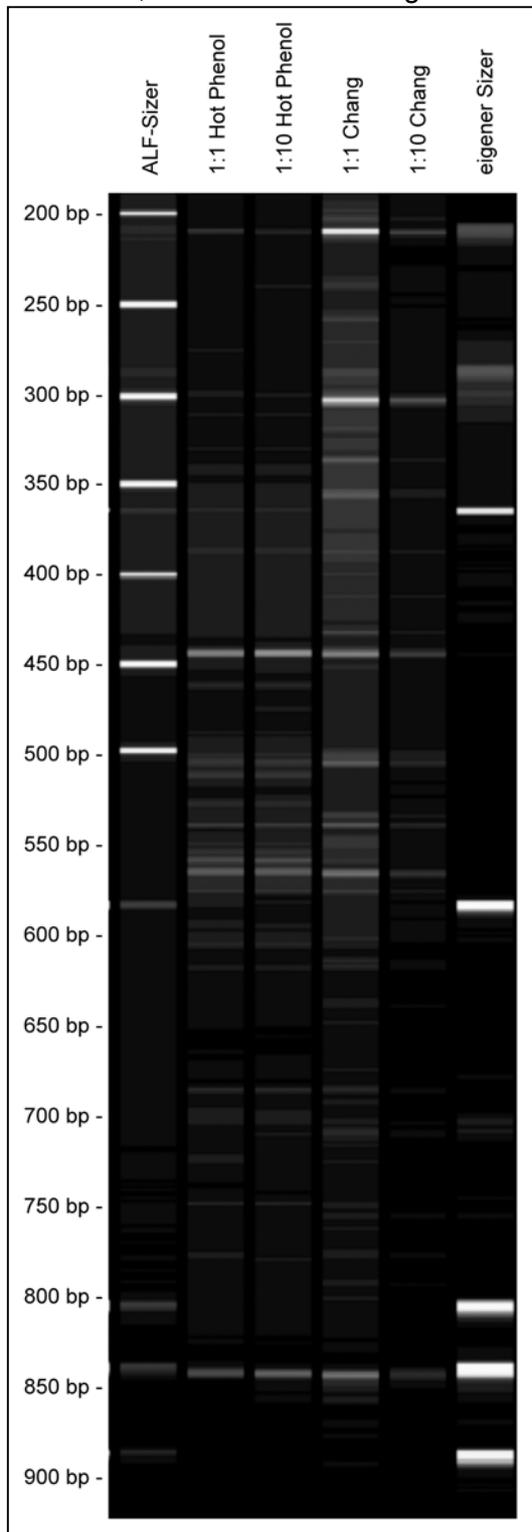


Abb. 25: RISA PCR Produkt Auftrennung auf einem ReproGel™ High Resolution Gel. Bei der PCR handelt es sich um eine re-Amplifikation eines RISA RT-PCR Produktes von *O. longistaminata* Big Pot. Es wurden 25 Zyklen für die re-Amplifikation verwendet. Zwei verschiedene Templates (Hot Phenol Extraktion und Chang Extraktion) in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 µl und 0,1 µl) wurden verwendet. Als Marker diente zum einen der ALFexpress™ Sizer® 50-500 (ALF Sizer)

3.1.6 Vergleich der *nifH* Expressionslevel von Kulturreis und Wildreis

Anhand des *nifH* Expressionslevel ist es möglich, die Zahl der Bakterien abzuschätzen, welche in den Wurzeln Stickstoff fixieren. In dieser Arbeit sollten nun die *nifH* Expressionslevel verschiedener Reissorten untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk galt dem Unterschied zwischen Wild- und Kulturreis.

Für die Ermittlung der Expressionslevel wurde die bakterielle RNA mittels der Chang-Methode (2.2.8.1) aus ca. 700 mg Frischgewicht an Wurzeln extrahiert. Nach einer DNase-Behandlung wurde das RNA Pellet in 15 µl Wasser aufgenommen und anschließend eine RT-PCR mit dem RT-Primer TH580 und den beiden nested Primern Zehr *nifH* forward und Zehr *nifH* reverse durchgeführt. Hierbei wurde eine 10er Verdünnungsreihe mit 0,5 µl Template im ersten Ansatz verwendet. Um zu kontrollieren, ob es zu einer Inhibition der PCR Reaktion durch Verunreinigung der RNA-Lösung kam, wurde ein weiterer Ansatz wie oben beschrieben durchgeführt und diesem 25 ng total RNA einer stickstofffixierenden *Azoarcus* sp. BH72 Kultur zugefügt. Ein dritter Ansatz bestand aus einer 10er Verdünnungsreihe reiner total RNA von *Azoarcus* sp. BH72 mit einer Templatemenge von 25 ng im ersten Ansatz. Ein Vergleich mit dem Ansatz zuvor ermöglichte eine Aussage, ob ein Inhibitor vorlag oder nicht. Exemplarisch für eine Wildreis Pflanze (*O. longistaminata* Big Pot) und einen Kulturreis (*O. sativa* IR72) sind die Gelbilder in Abb. 26 dargestellt. Die Gelbilder der anderen Quantifizierungen befinden sich im Anhang. Alle Proben wurden auf 2%ige, mit Ethidiumbromid vorgefärbte Gele aufgetragen. Anhand der Verdünnung, bis zu der noch eine Band zu erkennen ist, konnte auf die Gesamtzahl an stickstofffixierenden Bakterien rückgeschlossen werden (siehe 3.1.4). Die Zahlen für alle untersuchten Pflanzen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

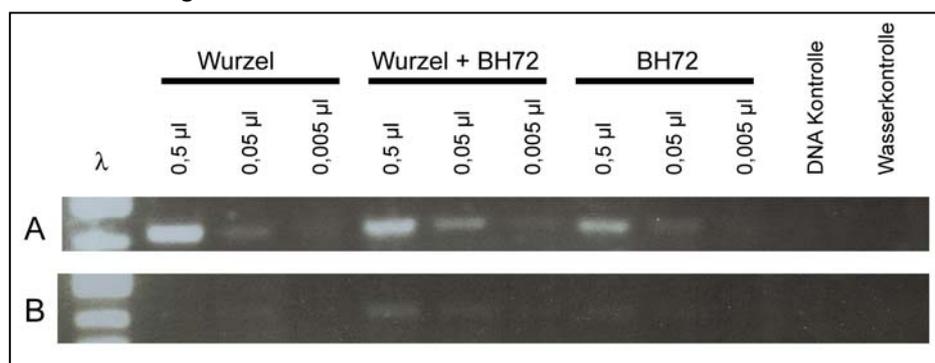


Abb. 26: Quantifizierung von Stickstofffixierenden Bakterien in Wild- (A) und Kulturreis (B). A. Wildreis *O. longistaminata* Big Pot. B. Kulturreis *O. sativa* IR72. Es wurden RT-PCR Reaktionen mit je 3 10er Verdünnungen an Template verwendet. Zum einen diente nur die isolierte RNA (Wurzel), zum anderen die Isolierte RNA von *Azoarcus* sp. BH72 versetzt (Wurzel + BH72) und total RNA von *Azoarcus* sp. BH72 alleine (BH72) als Template. Die Auftrennung erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel. Als Längenstandard diente mit *PstI* verdaute DNA des Lambda Phagen (λ).

Tabelle 9: Quantifizierung von Stickstofffixierenden Bakterien in Wild- und Kulturreis

Reisart	Herkunft	Zahl der N ₂ -fixierenden Bakt.
<i>O. longistaminata</i> Namibia 2 (W)	Namibia	1 x 10 ¹¹
<i>O. longistaminata</i> Namibia 2 (W)	Namibia	1 x 10 ¹¹
<i>O. longistaminata</i> Namibia 3B (W)	Namibia	1 x 10 ¹¹
<i>O. longistaminata</i> Namibia 4 (W)	Namibia	1 x 10 ¹¹
<i>O. longistaminata</i> Namibia 5o (W)	Namibia	1 x 10 ¹¹
<i>O. longistaminata</i> Big Pot (W)	Gewächshaus	1 x 10 ¹²
<i>O. longistaminata</i> Big Pot (W)	Gewächshaus	1 x 10 ¹²
<i>O. longistaminata</i> 22 (W)	Philippinen	1 x 10 ¹¹
<i>O. sativa</i> IR72 (K)	Philippinen	8 x 10 ⁹
<i>O. sativa</i> IR72 Pot (K)	Gewächshaus	8 x 10 ⁹
<i>O. sativa</i> NPT (K)	Philippinen	Unter Nachweisgrenze
<i>O. sativa</i> IR42 (K)	Philippinen	1 x 10 ¹⁰

(W) = Wildreis; (K) = Kulturreis

Die Werte beziehen sich auf jeweils eine Extraktion und RT-PCR.

Es ist zu erkennen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildreis-Arten und Kulturreis vorliegt. Die Anzahl an Bakterien in den Wildreisarten lag 2 bis 3 10er Potenzen (10¹¹ bis 10¹² Bakterien pro Gramm Trockengewicht) höher als bei Kulturreis (10⁸ bis 10⁹ Bakterien pro Gramm Trockengewicht).

3.1.7 Erfassung der Diversität auf *nifH* Gen Ebene

Um die Diversität der Bakterien zu erfassen, wurde das PCR Produkt der höchsten Verdünnung, welche bei der oben beschriebenen Quantifizierung noch eine gut sichtbare Bande auf dem Agarosegel erzeugte, mittels des TOPO TA Cloning Kits kloniert. Klone mit einem Insert wurden über eine Blau-Weiß Selektion identifiziert. Von diesen wurde eine Klonbank angelegt und diese mit einer generellen *nifH*-Sonde auf solche Klone hin untersucht, die das *nifH* Fragment trugen. Als Sonde diente ein Mix aus folgenden *nifH* PCR-Sonden: Ruf 3a 64;g4 (2); g1-11; 15-102 und 15-8n. Hierbei handelt es sich um die Sequenzen von *nifH* Klonen, welche aus Reiwurzeln isoliert wurden (Engelhard, Hurek und Reinhold-Hurek 2000). Aus diesen Klonen wurde mittels Mini Plasmid Präparation das Plasmid isoliert und das Insert sequenziert. Die 105 erhaltenen Sequenzen wurden in ein bestehendes Alignment, welches aus 195 *nifH* Sequenzen kultivierter Bakterien bestand, eingefügt und von Hand aligned. Hierzu wurde das Programm GeneDoc v 2.6 verwendet. Anschließend wurde das Alignment in Proteinsequenzen umgeschrieben und im Fasta-Format exportiert. Mit Hilfe des Programms Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001) wurde das Fasta-File in ein Mega-File umgeschrieben und anschließend mit folgenden Parametern phylogenetisch ausgewertet: Gaps/Missing data: Pairwise Deletion; Distance method: Amin: Poisson correction [Pairwise distance]; Tree marking method: Neighbor-joining. No. Of Sites:128

Ergebnisse

In Abb. 27 sind zwei Bäume dargestellt. Hierbei handelt es sich um die selbe Berechnung. Im Baum A. sind die Sequenzen kultivierter Bakterien markiert. Unterschiedlichen Gruppen wurden verschiedene Farben zugeteilt. Auf diese Weise konnten die verschiedenen Äste den unterschiedlichen Bakterien Clustern zugeordnet werden. In Baum B. wurden die Sequenzen markiert, welche im Laufe dieser Arbeit isoliert wurden. Hier wurde die Herkunft der Sequenzen in unterschiedlichen Farben markiert. Die Bezeichnung der einzelnen Cluster richtet sich nach Chien (Chien und Zinder 1996).

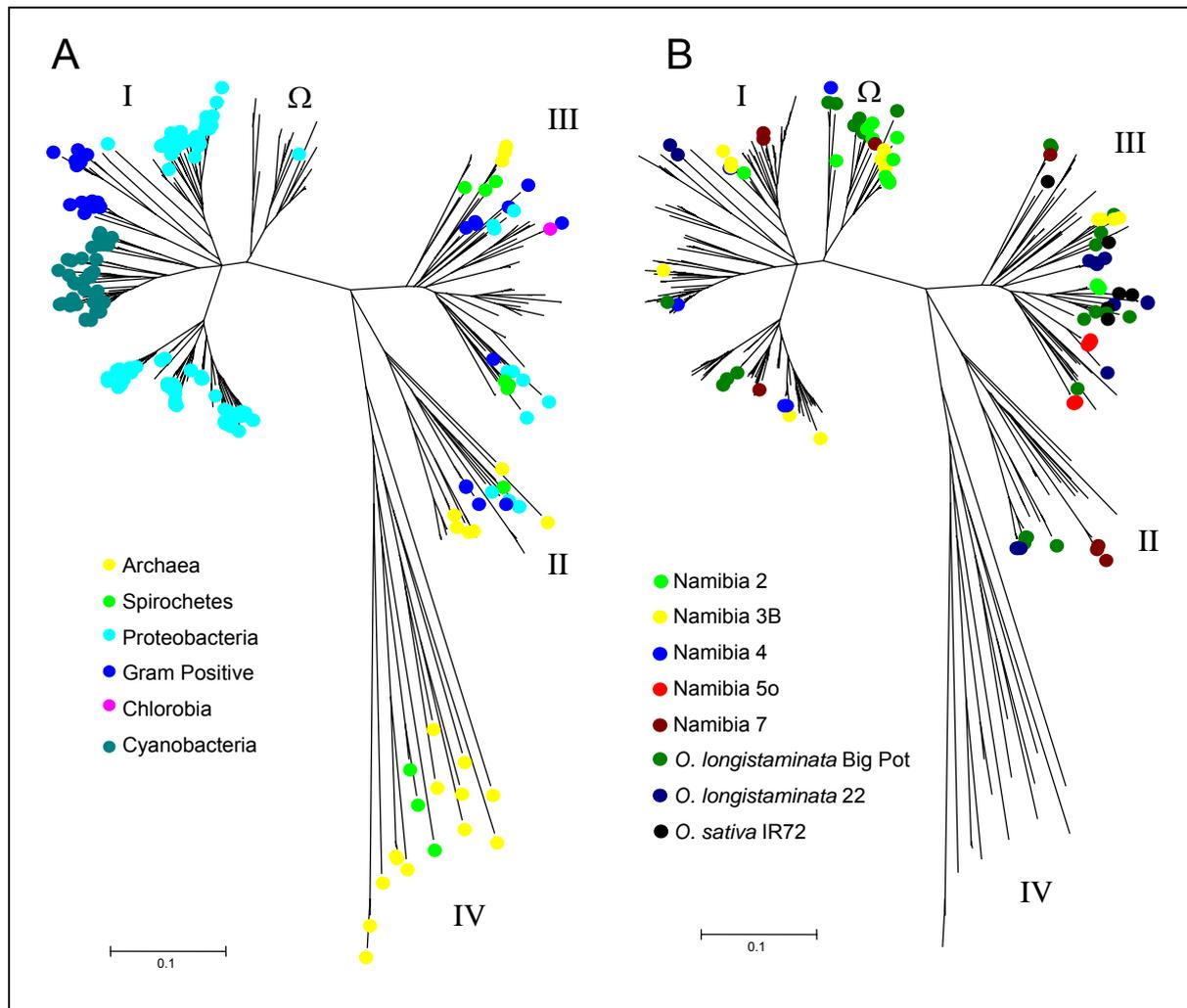


Abb. 27: Phylogenetische Auswertung der in dieser Arbeit isolierten Sequenzen. A. Markierung der Sequenzen, die von Isolatoren stammen. Farblich markiert nach phylogentischer Einteilung der Bakterien. B. Markierung der nifH mRNA Sequenzen, welche im Zuge dieser Arbeit isoliert wurden. Farblich markiert nach Herkunft der Pflanze.

In Abb. 28 wurde das Gram-Positiv-Cluster (III) separat dargestellt. Auch hier wurden die Sequenzen markiert, welche in dieser Arbeit isoliert wurden. Sequenzen, welche aus den Pflanzen Namibia 50 und *O. sativa* IR72 von den Philippinen isoliert wurden, sind ausschließlich in diesem Cluster vertreten. Es ist zu erkennen, dass Sequenzen, welche aus der Pflanze *O. longistaminata* Namibia 50 isoliert wurden, in zwei Gruppen clustern, welche

Ergebnisse

sehr eng miteinander verwandt sind. Ein Vergleich der Sequenzen auf DNA Ebene zeigte eine Übereinstimmung von mehr als 99% innerhalb jeder Gruppe. Zum Teil sind die Sequenzen identisch oder unterscheiden sich nur in einer Base. Sequenzen aus *O. sativa* IR72 hingegen sind über den gesamten Ast des Gram-Positiv-Clusters verteilt.

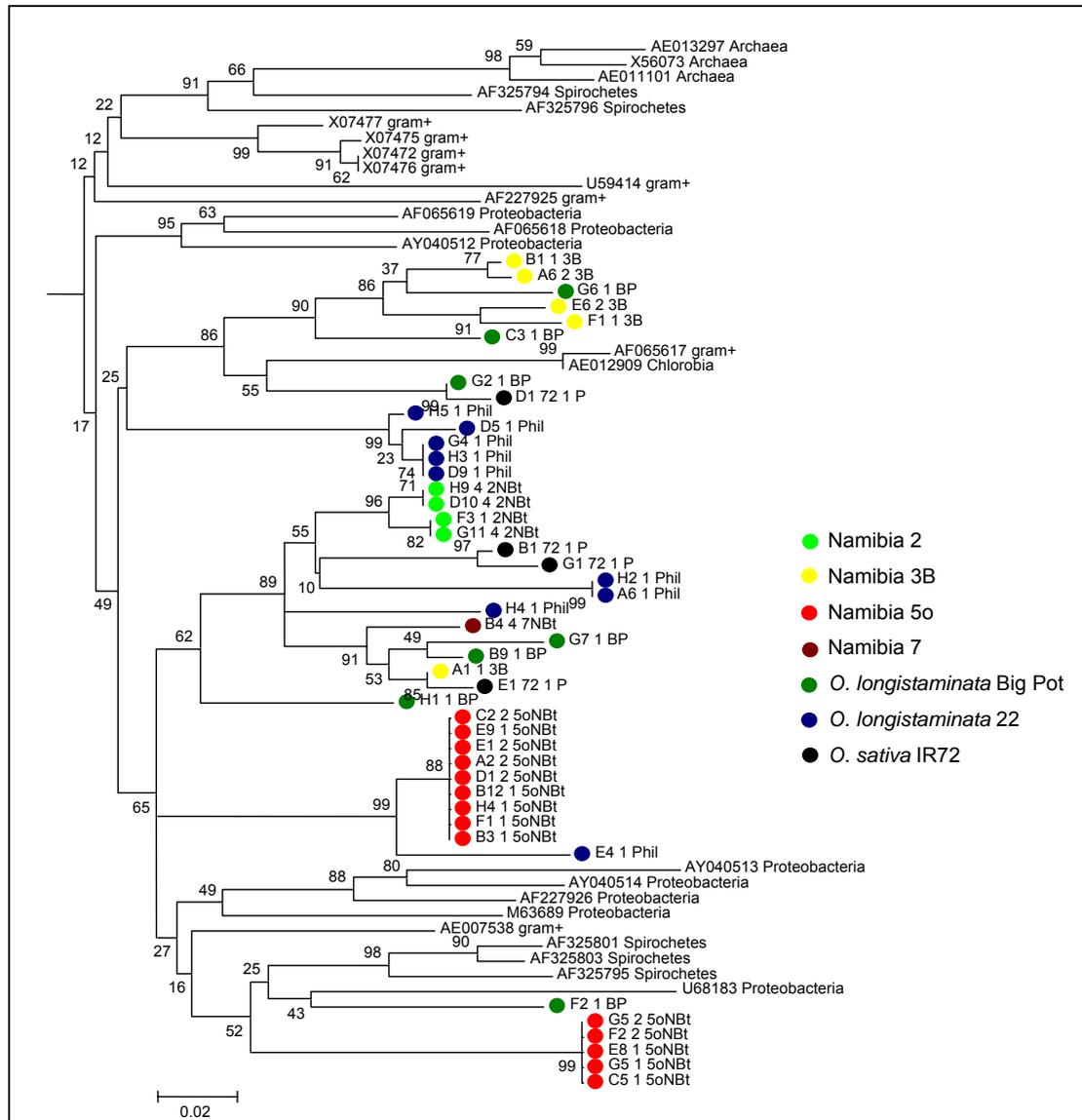


Abb. 28: Detailansicht des Cluster III. Farbliche Markierung nach Herkunft der Pflanzen.

Das Ω -Cluster (Hurek *et al.* 2002) wurde in Abb. 29 gesondert hervor gehoben. Für dieses Cluster gibt es bisher nur ein einziges Isolat, welches zu den Delta-Proteobakterien gerechnet wird. In diesem Cluster sind Sequenzen aus *O. longistaminata* Big Pot, sowie Namibia 2, Namibia 3 und Namibia 7 vertreten. Die Extraktion von Namibia 2 wurde zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten unternommen. Die erste Extraktion (hellgrüner Ball) ergab nur zwei Gruppen von Sequenzen, eine im Ω -Cluster und eine im Cluster III (Abb. 28). Die Sequenzen der einzelnen Gruppen waren untereinander bis zu 99% identisch. Eine weitere Extraktion aus Namibia 2, welche zu einem späten Zeitpunkt in dieser Arbeit gemacht wurde,

Ergebnisse

(hellgrünes Dreieck) ergab eine höhere Diversität an Sequenzen. Allerdings fallen auch hier 85% der isolierten Sequenzen ins Ω -Cluster. Der Level an *nifH* mRNA war bei der zweiten Isolation jedoch um 2 Größenordnungen geringer als bei der ersten Isolation. Diese Pflanzen Probe wurde für mehrere Versuche verwendet, sodass sie zwischen den beiden Extraktionen mehrmals aufgetaut worden war.

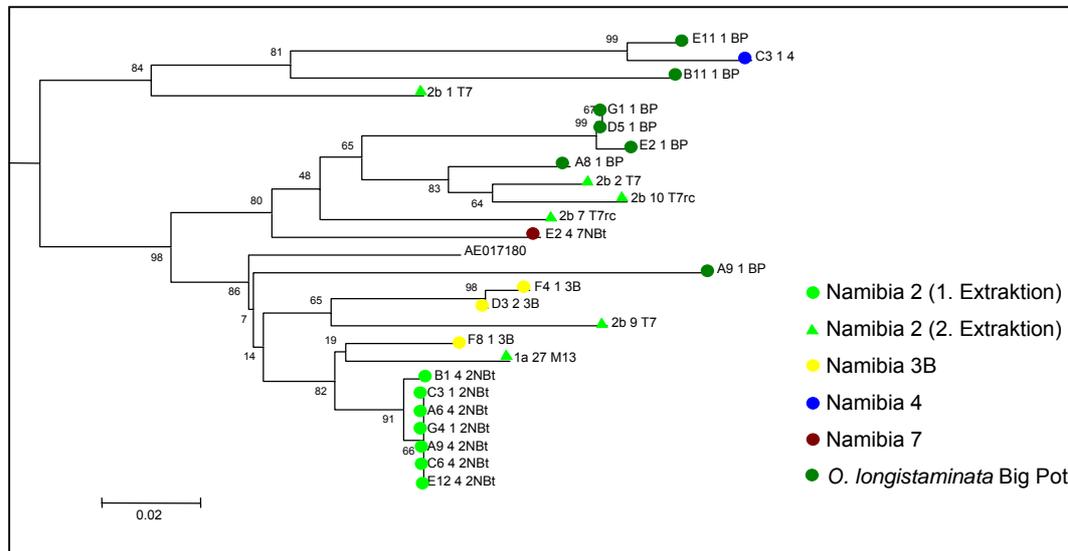


Abb. 29: Detailansicht des Ω -Cluster. Farbliche Markierung nach Herkunft der Pflanzen.

Alles in allem wurden im Laufe dieser Arbeit 105 neue *nifH* Gene sequenziert. 24 dieser Sequenzen fielen in das Ω -Cluster.

3.1.8 Erfassung der Diversität auf 16S rDNA Ebene

Pflanzen die eine geringe Diversität auf *nifH* Gen Ebene aufwiesen, wurden mittels der unter 3.1.5 beschriebenen RISA PCR Methode auf Ihre 16S Diversität hin untersucht. Neben den *nifH* niedrigdiversitäts Pflanzen Namibia 2 und Namibia 5o wurden weiterhin die Pflanze *O. longistaminata* Big Bot und *Oryza rufipogon* 3c. untersucht. Letztere zeigte in früheren Versuchen einen Anteil von ca. 80% der Sequenzen im Ω -Cluster (Hurek, mündliche Mitteilung). *O. longistaminata* war auf Grund der hohen Anzahl an verschiedenen Versuchen, welche im Zusammenhang mit anderen Arbeiten durchgeführt wurden, ein interessanter Kandidat. In einem ersten Versuch wurden RISA PCRs von Hot Phenol Extraktionen der oben genannten Pflanzen durchgeführt. Hierbei wurden die Bedingungen verwendet wie sie unter 3.1.5 beschrieben sind. Als Primerpaar wurde 1338f und LD-bact-132-aA verwendet. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte über 3,5%ige Polyacrylamidgele. Hierbei wurden jeweils 9 μ l der PCR Produkte geladen. Die Gele wurden nach dem Lauf mit Ethidiumbromid gefärbt und am Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, part of

Ergebnisse

Amersham Pharmacia Biotech) eingescannt. Hierbei wurden Standarteinstellungen verwendet. Die so erhaltenen Bilder sind in Abb. 30 dargestellt.

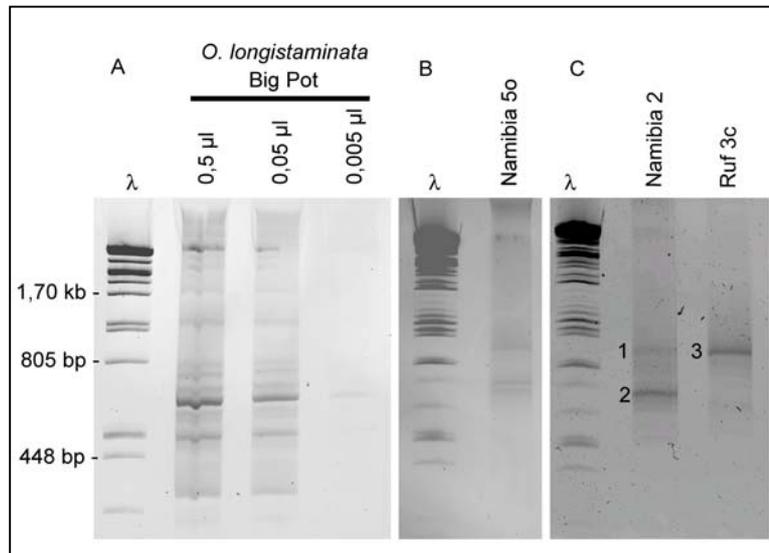


Abb. 30: RISA PCR von Hot Phenol Extraktionen verschiedener Pflanzen. A. *O. longistaminata* Big Pot (verschiedene Template Konzentrationen). B. Namibia 5o. C. Namibia 2 und *O. rufipogon* 3c. Markierte Banden (1, 2 und 3) wurden für die unten beschriebene Klonierung verwendet. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgele. Als Längenstandard diente mit *Pst*I Verdauete Lambda DNA (λ).

Als nächstes wurden die restlichen PCR Produkte der Extraktionen aus Namibia 2 und *O. rufipogon* 3c auf ein 1%iges Agarose Gel geladen, die entsprechend in Abb. 30 C. markierten Banden (1 – 3) ausgeschnitten und die Fragmente mittels des Qia-Quick Gel-Elutions Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die so gewonnenen Fragmente wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits kloniert. Klone, die ein Insert trugen, wurden durch ein Blau-Weiss Screening identifiziert und das Plasmid isoliert. Durch einen Restriktionsverdau der Plasmide wurden solche identifiziert, welche ein Insert in der Größe der auf dem Polyacrylamidgel beobachteten Banden trugen. Diese Plasmide wurden sequenziert. Von den so erhaltenen Sequenzen wurden mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, (Altschul *et al.* 1990) Network Services (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) die 5 nächsten Verwandten ermittelt und diese Sequenzen auf den Bereich von Position 1338 bis 1500 geschnitten und mit Hilfe des Programms ClustalX (Thompson *et al.* 1997) aligned. Nahe miteinander verwandte Sequenzen wurden in einem Alignment zusammengefasst. Die so erhaltenen Alignments wurden im Fasta-Format exportiert, mittels Mega 2.1 ins Mega-Format umgeschrieben und mit folgenden Parametern phylogenetisch ausgewertet: Gaps/Missing data: Pairwise Deletion; Codon Positions: Noncoding; Distance method: Nukleotide: Jukes-Cantor [Pairwise distance]; Tree marking method: Minimum evolution. No. Of Sites:174. Interior Branch Test mit 100 Wiederholungen. Hierbei wurden Sequenzen näher verwandter Organismen in

Ergebnisse

einem Baum zusammengefasst. Auf diese Weise wurden 5 Einzel-Bäume erstellt (siehe Abb. 31). Baum A enthält Sequenzen aus dem Phylum der *Proteobacteria*. In Baum B sind *Acidobacteria* zu finden, und Baum C enthält Sequenzen aus dem Phylum *Chloroflexi*. In Baum D fallen Sequenzen der Phyla *Firmicutes* und *Actinobacteria*. Baum E enthält eine Sequenz aus dem Phylum *Bacteroidetes* und eine Sequenz aus dem Phylum der *Proteobacteria*.

Es ist zu erkennen, dass Sequenzen, welche aus der Bande 1 (Namibia 2) und Bande 3 (*O. rufipogon* 3c) stammen, in mehreren Bäumen vertreten sind. Diese beiden Banden wiesen die gleiche Länge an Basenpaaren auf. Sie lag bei ca. 850 bp. Alle bis auf eine Sequenz, welche aus der Bande 2 (Namibia 2) stammen, clustern zusammen mit Sequenzen des Phylums *Actinobacteria*. Nur eine Sequenz ist im Phylum *Proteobacteria* zu finden.

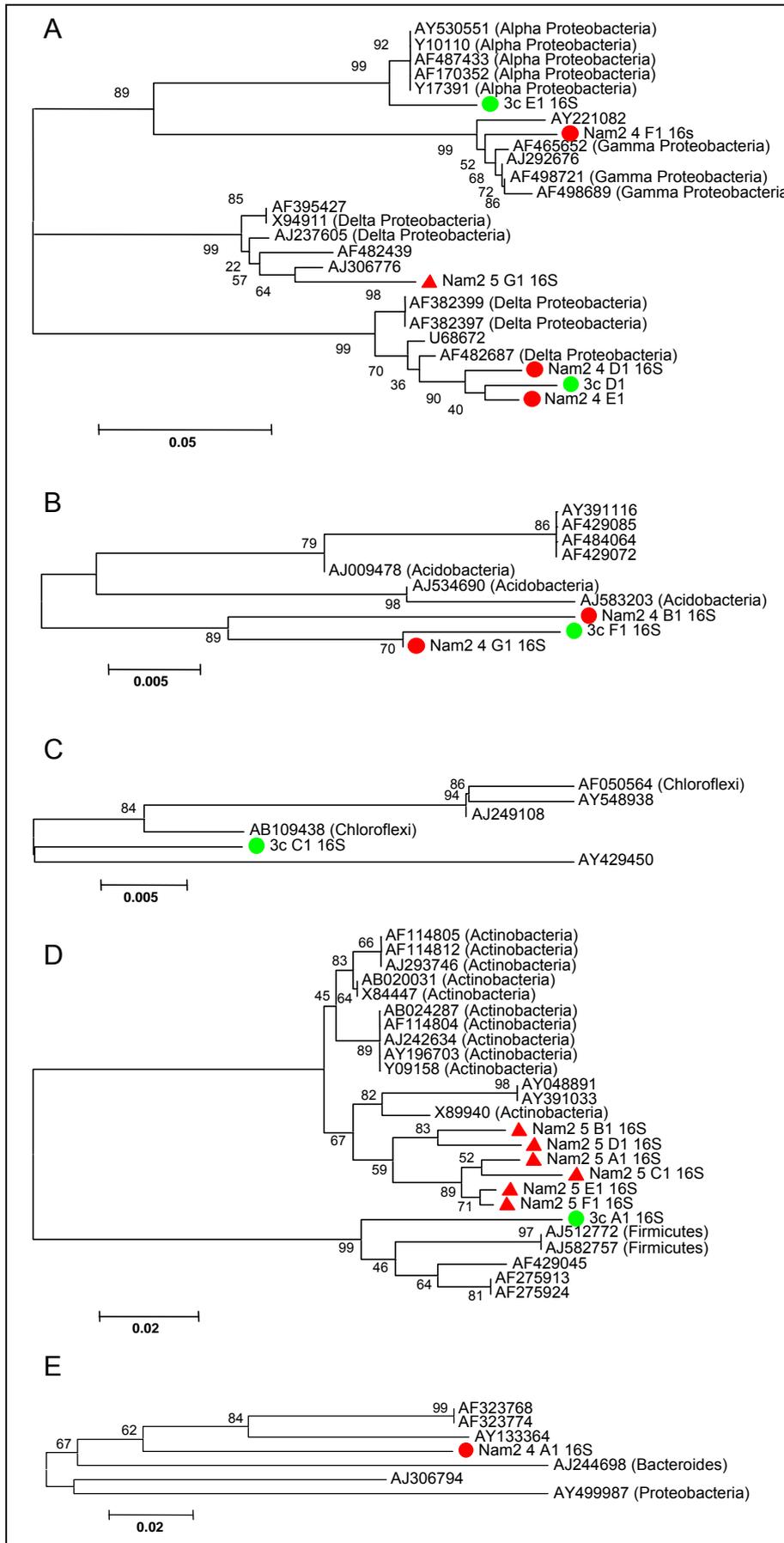


Abb. 31: Phylogentische Auswertung der Sequenzen, welche aus RISA PCR der Pflanzen Namibia 2 und *O. rufipogon* 3c gewonnen wurden sowie deren 5 nächsten, mit Blast ermittelten, Verwandten aus der NCBI Datenbank. Sequenzen nahe verwandter Organismen wurden in jeweils einem Baum zusammengefasst. A *Proteobacteria*, B *Acidobacteria*, C *Chloroflexi*, D *Firmicutes* und *Actinobacteria*, E *Bacteroidetes* und *Proteobacteria*. Die Herkunft der eigenen Sequenzen ist farblich markiert:
 ● Namibia 2 (Bande 1);
 ▲ Namibia 2 (Bande 2);
 ● *O. rufipogon* 3c (Bande 3).

Ergebnisse

Um den Effekt zu untersuchen, welcher die verwendeten Extraktionsmethoden auf die ermittelte Diversität hat, wurde in einem nächsten Versuch mittels Chang Extraktion aus Wurzeln der Pflanzen *O. rufipogon* 3c, Namibia 2 und *O. longistaminata* Big Pot Nukleinsäure extrahiert. Hierbei wurden zwei Parallelen durchgeführt. Zum einen wurde die original Chang Methode, zum anderen die Chang Methode mit Protease K Schritt (siehe 3.1.2) verwendet. Von jeder Extraktion wurde eine RISA PCR durchgeführt. Hierbei wurden je 0,5 µl und 0,05 µl als Template eingesetzt. Je 9 µl der PCR Produkte wurden auf ein 3,5%iges Polyacrylamidgel geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und am Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, part of Amersham Pharmacia Biotech) eingescannt (Abb. 32). Hierbei wurden die unter 2.2.7.2 aufgeführten Einstellungen verwendet. Es ist zu erkennen, dass sich die Bandenmuster der beiden unterschiedlichen Extraktionen gleichen. Einzig die Intensität der Banden variiert. Ein Vergleich mit dem Bandenmuster, welches bei der Phenol Extraktion beobachtet wurde, zeigt eine deutlich höhere Zahl an Banden in den beiden Chang Extraktionen. Bei *O. rufipogon* 3c ist eine weitere Bande bei einer Größe von ca. 700 bp zu erkennen, Bei Namibia 2 sind eine Vielzahl weiterer Banden im Vergleich zu den 2 Banden der Phenol Extraktion zu erkennen.

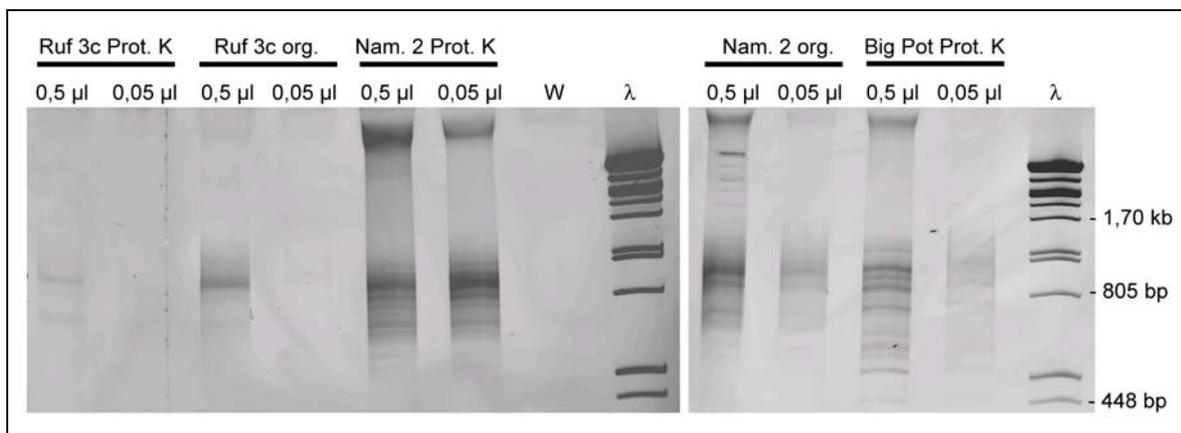


Abb. 32: RISA PCR von *O. rufipogon* 3c, Namibia 2 und *O. longistaminata* Big Pot. Template aus Chang Extraktionen mit und ohne Protease K Schritt. Es wurden jeweils 2 unterschiedliche Mengen an Template (0,5 µl und 0,05 µl) für die PCR verwendet. W bezeichnet die Wasserkontrolle. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgele. Als Längenstandart diente mit *PstI* verdaute Lambda DNA (λ).

Mit den bei der RISA PCR verwendeten Primern ist eine Amplifikation von *Archaea*-IGS Fragmenten nicht möglich. Um ein Vorhandensein von *Archaea* auszuschließen, wurde eine RISA PCR mit *Archaea* spezifischen Primern durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Annealing Temperaturen (50°C, 52°C und 54°C) verwendet. Die anderen Bedingungen waren wie für die oben beschriebene bakterienspezifische RISA PCR. In keinem der PCR Ansätze konnte ein Amplifikat beobachtet werden (siehe Abb. 33).

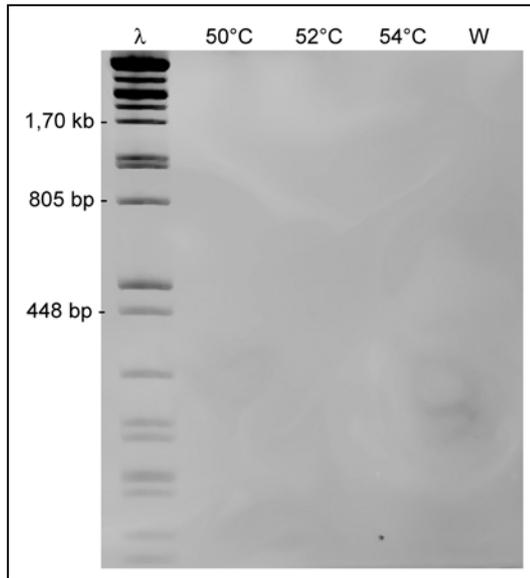


Abb. 33: RISA PCR von Namibia 2 Template mit *Archaea* spezifischen Primern. Es wurden 3 verschiedene Annealing Temperaturen (50°C; 52°C und 54°C) verwendet. W bezeichnet die Wasserkontrolle. Auftrennung auf einem 3,5%igem Polyacrylamidgele. Als Längenstandard diente mit *Pst*I Verdauter Lambda DNA (λ).

In einem weiteren Ansatz wurden 2 g Wurzelprobe von Namibia 2 in flüssigem Stickstoff gemörsert. Je 800 mg des gemörserten Materials wurden für je eine Chang Extraktion mit und ohne Proteinase K Schritt verwendet, die restlichen 400 mg wurden auf zwei Cold/Hot Phenol Extraktionen verteilt, wobei von einer der Extraktionen im Anschluss eine Aufreinigung der Isolierten Nukleinsäure über eine Sephadex G200 Säule durchgeführt wurde. Von jeder Extraktion wurde eine RISA PCR durchgeführt, wobei 0,5 μ l; 0,05 μ l und 0,005 μ l als Template verwendet wurden. Von den PCR Produkten wurden 4 μ l und 46 μ l auf ein ALF Gel geladen. Hierfür wurden die 46 μ l PCR Produkt mit 3 Volumina Ethanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 3M Natrium Acetat (pH 5,2) für 1 h bei -70°C gefällt und die Nukleinsäuren anschließend durch eine Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde 2 mal in 80%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 4 μ l TE-Puffer aufgenommen. Es wurden die Bedingungen wie unter 3.1.5 beschrieben verwendet. Es ist zu erkennen, dass es zu einigen Unterschieden in den Bandenmustern der einzelnen Extraktionen kommt. Die RISA PCR von Template aus der originalen Chang-Extraktion liefert das Muster mit den meisten Banden. Hier sind fast alle Banden der übrigen Ansätze auch vertreten. Einzig die Banden über einer Größe von 850 bp, wie z.B. in der modifizierten Chang Methode bei 870 bp, fehlen hier ganz. In den beiden RISA PCR Reaktionen der Hot Phenol Extraktionen sind kleinere Fragmente unterhalb einer Größe von 650 bp nur extrem schwach zu erkennen. Außerdem kann hierbei beobachtet werden, dass in den beiden Ansätzen, bei denen 0,5 μ l Template eingesetzt wurde keine, bzw. nur sehr schwache PCR Produkte zu erkennen sind.

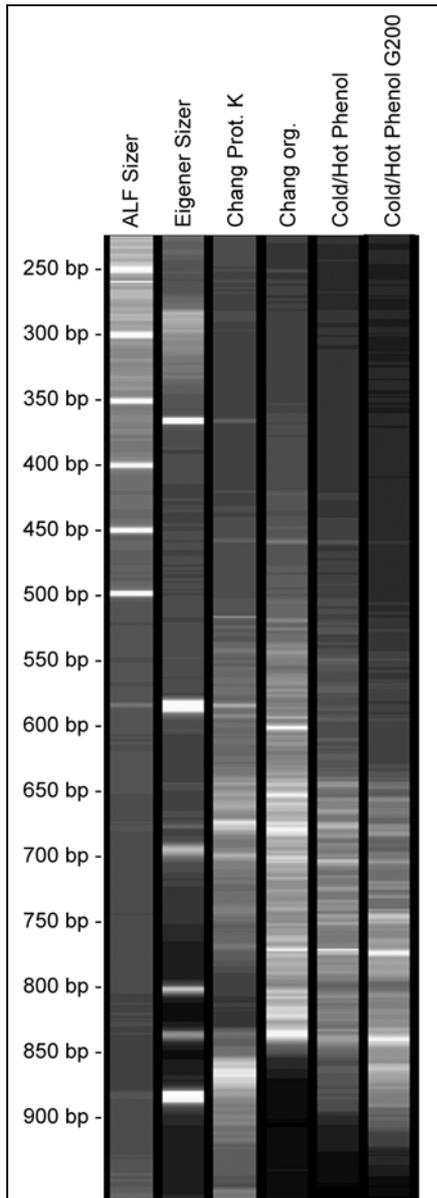


Abb. 34 Vergleich der RISA PCR Bandenmuster vom Namibia 2 Template unter Verwendung verschiedener Extraktionsmethoden. Die Auftrennung erfolgte auf einem ReproGel™ High Resolution Gel. Als Marker diente zum einen der ALFexpress™ Sizer® 50-500 (ALF Sizer)

4 Diskussion

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste Teil bestand in der Entwicklung neuer und Weiterentwicklung bestehender Methoden zur Erfassung der Biodiversität von Mikroorganismen in Wurzeln von Gräsern, speziell Reis. Im zweiten Teil wurden diese Methoden auf einige ausgewählte Pflanzen angewendet.

4.1.1 Optimierung der Extraktionsmethoden

Die Pflanzenwurzeln, welche in dieser Arbeit auf die in ihnen enthaltene mikrobielle Diversität hin untersucht werden sollen, besitzen einige Eigenschaften, welche eine Extraktion von Nukleinsäuren erschweren. So enthalten sie einen hohen Anteil an phenolischen Bestandteilen und Polysacchariden und eine große Menge an RNasen. Die im Labor etablierte, von Dr. Thomas Hurek (Hurek *et al.* 2002) weiterentwickelte Methode zur Extraktion großer Mengen an RNA aus Pflanzenwurzeln basiert auf einer Methode, welche von Chang (Chang *et al.* 1993) entwickelt wurde. Die Probleme, welche durch die hohe Konzentration an phenolischen Bestandteilen entstehen, beruhen auf einer Oxidation dieser Bestandteile und einer anschließenden irreversiblen Anlagerung an die Nukleinsäure und somit einer Co-Prezipitation mit der RNA (Katterman und Shattuck 1983; Schneiderbauer, Sandermann und Ernst 1991). Dieses Problem wird durch den Einsatz der reduzierenden Reagenzien Polyvinylpyrrolidon und Mercaptopropanndiol gelöst. Der Einsatz von 2 M NaCl führt zu einer Prezipitation der Polysacchariden und des im Puffer als Detergenz verwendeten CTABs.

Die Bakterien werden bei dieser Methode auf chemisch / enzymatischem Wege lysiert. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die mechanische Lyse weit effektiver ist als die enzymatische oder chemische Lyse (Reilly und Attwood 1998), und es ist zudem bekannt, dass es bei einer chemisch enzymatischen Lyse zu einer Unterrepräsentation Gram-positiver Bakterien kommen kann (von Wintzingerode, Gobel und Stackebrandt 1997). Da dieser Schritt zudem unter Bedingungen durchgeführt wurde, bei denen Ribonukleasen nicht durch Reagenzien oder Temperatur inaktiviert waren, entstand hier eine weitere mögliche Fehlerquelle in Bezug auf die Erfassung der gesamten Diversität. Durch die in dieser Arbeit eingeführte mechanische Lyse der Bakterien mittels einer Zelmühle konnte diese potentielle Fehlerquelle minimiert werden. Vergleich der Extraktionseffizienz der beiden Methoden zeigten jedoch keinen Unterschied, was darauf schließen lässt, dass in diesem speziellen Fall beide Methoden gleich geeignet sind, um bakterielle RNA aus Wurzelproben zu extrahieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einsatz der mechanischen Lyse auch einige Nachteile mit sich bringt. So konnte durch Hybridisierungs-Versuche mit

eubakteriellen 16s rRNA Sonden gezeigt werden, dass DANN, welche durch eine mechanische Lyse der Bakterien gewonnen wurde, im hohen Maße fragmentiert ist und einen verhältnismäßig geringen Anteil an eubakterieller DNA enthält (Amann *et al.* 1990; Leff *et al.* 1995). Die Fragmentierung kann zudem zu einem Auftreten von PCR Artefakten durch die Bildung von schimärischen PCR Produkten führen, wie es bei 16S rRNA Amplifikationen beobachtet wurde (Liesack, Weyland und Stackebrandt 1991). Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Da die Fragmentierung jedoch hauptsächlich bei DNA vorkommt, wie in Abb. 7 zu erkennen ist, wurde im folgenden die Methode mit der mechanischen Lyse verwendet.

Die auf diese Weise modifizierte Methode wurde verwendet, um verschiedene Reiserarten auf die mikrobielle Diversität auf *nifH* Gen Ebene innerhalb ihrer Wurzeln hin zu untersuchen. Die so ermittelten Daten werden weiter unten diskutiert.

Um die Diversität nicht nur auf *nifH* Gen Ebene zu erfassen, sondern auch gleichzeitig einen Überblick über die 16s rRNA Diversität zum Zeitpunkt der Extraktion zu bekommen, ist es nötig, eine Methode zu verwenden, von deren extrahierter Nukleinsäure es möglich ist, sowohl das *nifH* Gen als auch die 16S rRNA zu amplifizieren. Eine Amplifikation beider Fragmente von ein und der selben Extraktion minimiert Fehlerquellen, welche durch eine mögliche inhomogene Verteilung der Bakterien innerhalb der Wurzel entstehen können. Auch ist es bekannt, dass der Einsatz verschiedener Extraktionsmethoden zu einem unterschiedlichen Ergebnis der beobachteten Diversität führen kann (Krsek und Wellington 1999).

Der Versuch, von einer nach der Chang Methode extrahierten RNA ein 16S Genfragment mittels RT-PCR zu amplifizieren, schlug fehl. Erst nach einer Modifikation durch eine zusätzliche Behandlung mit Proteinase K während der Extraktion war es möglich, ein 16S Genfragment zu amplifizieren (Abb. 3). Eine mögliche Ursache hierfür sind Proteine, welche mit der rRNA assoziiert sind. RNA, welche mit Proteinen assoziiert ist, würde bei einer Phenol/Chloroform Extraktion wie sie während der anschließenden DNase Behandlung durchgeführt wird, in der Interphase angereichert und so nicht mit isoliert werden. Dieses wäre eine Erklärung, weshalb eine Amplifikation nach einer Proteinase K Behandlung möglich ist, da hier die mit der rRNA assoziierten Proteine entfernt würden.

4.1.2 Überprüfung der RNA Qualität

Um die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen, wird die extrahierte RNA im allgemeinen auf einem RNA Gel aufgetrennt und die Bandenstärke der beiden ribosomalen Untereinheiten 16S/23S bzw. 18S/28S ausgewertet. Im Idealfall liegt das Verhältnis auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel bei 2,7:1. Diese Art der Qualitätskontrolle ist weit verbreitet, und mit dem Aligen 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) steht ein Gerät zur

Verfügung, das eine Kombination aus Microfluidics, Kapillar Elektrophorese und Fluoreszenz nutzt, um die RNA Konzentration und Integrität zu bestimmen (Ding *et al.* 2003).

Eine Überprüfung der RNA Qualität aus einer Chang-Extraktion mittels einer Auftrennung des Extraktes auf einem Polyacrylamidgel zeigte, dass die Konzentration der isolierten RNA zu niedrig war, um eine sichtbare Bande auf dem Gel zu erzeugen (Abb. 4). Bei einer Überprüfung der Stabilität von RNA innerhalb des Extraktionspuffers unter verschiedenen Bedingungen (Abb. 5) konnte gezeigt werden, dass es zu einem Abbau der RNA kommt. Hierbei war die RNA der großen Ribosomalen Untereinheit stärker betroffen als die der kleinen Untereinheit. Von fast allen *Protostomia* mit Ausnahme der *Nematodes* und *Aphidoidea* ist es bekannt, dass ihre 28S rRNA „Hidden breaks“ aufweist (Ishikawa 1977). Hierbei handelt es sich um Sollbruchstellen, welche die 28S rRNA in kleinere Untereinheiten aufspalten. Ein Auftreten dieser Sollbruchstellen, bevorzugt bei der großen Untereinheit der bakteriellen rRNA, wäre eine Erklärung für den präferenziellen Abbau. Auch direkt mit der RNA assoziierte Ribonukleasen könnten eine Erklärung für den beobachteten Effekt sein.

Da das Ziel dieser Arbeit die Erfassung möglichst der gesamten mikrobiellen Diversität einer Wurzelprobe war, ist es nötig, eine Extraktionsmethode zu verwenden, welche in der Lage ist sämtliche RNA bzw. DNA zu isolieren. Das Fehlen der beiden ribosomalen Banden auf dem Gel lässt vermuten, dass ein Großteil der RNA während des Extraktionsprozesses verloren geht. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einem selektiven Abbau kommt und so bestimmte Gruppen von Bakterien möglicherweise unterrepräsentiert sind, wurden weitere Extraktionsmethoden auf die Qualität der extrahierten RNA hin untersucht.

Die Variation des pH-Wertes bei einer Hot-Phenol Methode (Abb. 6) zeigte, dass bereits der optimale pH-Wert verwendet wurde. Eine Erniedrigung des pH-Wertes von 5,5 auf 4 führte zu einer geringeren Ausbeute. Die Verwendung eines pH-Wertes von 8 führte dazu, dass die Konzentration der RNA unter der Nachweisgrenze im Ethidiumbromid gefärbten Acrylamid Gel lag. Dieser pH-Wert wurde verwendet, um eventuell eine Methode zu entwickeln mit der es möglich ist, sowohl RNA als auch DNA zu extrahieren. Bei der Verwendung eines sauren pH-Wertes kommt es zu einem Verlust eines Großteils der DNA, da diese in der Phenolphase angereichert wird.

Eine weitere kommerzielle Methode zur Extraktion von RNA und DNA ist der von der Firma peqlab (Erlangen) entwickelte Kit peqGOLD TriFast™. Hierbei wird neben Phenol noch der RNase Inhibitor Guanidinisothiocyanate verwendet. Die Qualität der extrahierten RNA war jedoch hierbei schlechter als bei der zuvor verwendeten Hot-Phenol Methode (Abb. 6). Luo (Luo und Stevens 1997) konnte zeigen, dass bestimmte RNasen gegen Denaturierung durch Guanidinisothiocyanate und 2-Mercaptoethanol resistent sind.

Neben dem enzymatischem Abbau von RNA während der Extraktion, kann es noch zu einer mechanischen Zerstörung durch den eingesetzten Bio101 Biopulverizer kommen. Versuche

konnten zeigen, dass die RNA während der Behandlung nicht degeneriert wird. Die DNA wurde mit steigender Intensität der Behandlung stärker fragmentiert, wie schon von Wintzingerode (von Wintzingerode *et al.* 1997) beschrieben wurde. Der Durchmesser der eingesetzten Kugeln hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Fragmentierung. Auch das Vorhandensein der Phenolphase während der Behandlung in der Zelmühle und eine dadurch resultierende geringere Viskosität der Probe hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Fragmentierung (Abb. 11).

Die Durchführung einer Extraktion ohne den Zusatz von Wurzelproben zeigt, dass RNA während dieses Prozesses nur sehr schwach degradiert wird (Abb. 7). Sobald jedoch Wurzelmaterial im Extraktionsansatz vorhanden ist, wird auch zugegebene total-RNA von *Azoarcus* sp. BH72 degradiert (Abb. 8). Dieses zeigt, dass es durch die Zugabe der Wurzel zu einem massiven Anstieg an RNA degenerierenden Substanzen kommt.

Eine Inkubation der Wurzelprobe im Hot-Phenol-Puffer mit 100 µg / ml Proteinase K bei 37°C bzw. 65°C vor Zugabe von Phenol zeigt, dass die Proteinase K nicht ausreicht, um die in der Lösung vorhandenen RNasen zu inaktivieren (Abb. 9). Erst die Zugabe von Phenol kann eine Degradation der RNA verhindern. Auch eine Verdünnung der Probe durch den Einsatz der 4-fachen Menge an Hot-Phenol-Puffer und Phenol führt zu keiner Erhöhung der Ausbeute (Abb. 10). Hierbei ist umgekehrt eine relativ starke Abnahme der Konzentration der extrahierten RNA zu beobachten.

Die beste Qualität an RNA wurde, wie in Abbildung 12 zu erkennen, durch eine Modifikation der Hot-Phenol Methode erreicht, bei der in zwei Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C und 65°C) extrahiert wurde. Bei der 4°C Extraktion konnte das Bandenmuster beobachtet werden, welches schon bei den vorherigen Extraktionsvarianten zu beobachten war. Hier fehlten die Banden der beiden großen ribosomalen Untereinheiten 23S und 28S. Zudem wies das Extrakt eine tiefbraune Färbung auf. Dieses spricht für einen sehr hohen Anteil an phenolischen Bestandteilen, wie er schon bei allen anderen vorausgegangenen Variationen der Hot-Phenol Methode zu erkennen war. Der zweite Extraktions-Schritt, welcher bei 65°C durchgeführt wurde, zeigte nach Auftrennung der isolierten RNA auf dem Acrylamid Gel alle 4 Banden der ribosomalen Untereinheiten. Auch die Färbung war weitaus schwächer als bei den vorangegangenen Extraktionen. Einzig die RNA dieses zweiten Extraktionsschrittes war ohne vorherige Aufreinigung über eine Gelfiltration mittels einer PCR amplifizierbar. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Entfernung eines Großteils der phenolischen Bestandteile während des ersten bei 4°C durchgeführten Extraktionsschrittes. Bei dieser Temperatur würde eine Oxidation der phenolischen Bestandteile zu Quinonen und eine darauffolgende Anlagerung an die RNA (Loomis 1974) minimiert. Jedoch liegt der Nachteil dieser Methode in der Tatsache, dass

während des ersten Extraktionsschrittes schon ein Teil der RNA isoliert und somit für bei der Ermittlung der Diversität nicht mehr berücksichtigt wird.

Das generelle Problem bei der Extraktion mittels der Hot-Phenol-Methode beruht auf der Tatsache, dass hierbei keine reduzierenden Bestandteile im Puffer vorhanden sind, welche die Oxidation der phenolischen Bestandteile zu Quinonen inhibieren würde. Das Extrakt weist immer eine braune Färbung auf, welche auf die koprezipitierten phenolischen Bestandteile zurückzuführen ist.

Eine Aufreinigung des Extraktes aus einer Hot-Phenol-Extraktion über Gelfiltration mittels einer Sephadex G200 Säule führte zu einem Verlust an RNA (Abb. 14), was eine weitere Fehlerquelle in der Erfassung der gesamten Diversität darstellt. Laut Angaben des Herstellers liegt der Verlust bei einer Aufreinigung bei 10%. Da die Quinone kovalent an die Nukleinsäure gebunden sind (Loomis 1974) und die Matrix nach der Aufreinigung eine bräunliche Färbung aufwies, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust hierbei um einiges größer ist als vom Hersteller angegeben. Daher ist es ratsam, eine Methode zu verwenden, bei der eine nachträgliche Aufreinigung der Nukleinsäure nicht nötig ist.

Weitere getestete Methoden, welche nicht auf der Hot-Phenol Methode beruhten, führten zu einer Konzentration an RNA, die unterhalb der Nachweisgrenze des Polyacrylamidgels lag (Abb. 13). Beide Methoden nutzen Guanidinium Isothiocyanat als Ribonuklease-Inhibitor. Für diesen wurde gezeigt, dass einige RNasen gegen seine Wirkung resistent sind (Luo und Stevens 1997).

Bei keiner der verschiedenen Extraktionsmethoden konnte das theoretisch zu erwartende Verhältnis der 23S zur 16S rRNA von 2,7:1 beobachtet werden. Die Bande der 23S rRNA wies maximal die selbe Stärke wie die der 16S rRNA auf. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die von Winkler (Winkler 1979) erstmals in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium beschriebene Fragmentierung der 23S rRNA während der 23S Bildung sein. Hierbei handelt es sich um sogenannte Intervening Sequenzen in der 23S rRNA, welche eine Stemm-Loop-Struktur ausbilden. Diese bilden den Angriffspunkt für RNase III, welche die Intervening Sequenzen aus der 23S rRNA herausschneiden, ohne diese später wieder zu legieren. Hierdurch entsteht ein Bruch in der ribosomalen RNA der großen Untereinheit (Burgin *et al.* 1990). Diese Intervening Sequenzen konnten auch in verschiedenen Genera der *Enterobacteriaceae* (Pronk und Sanderson 2001) sowie in *Coxiella burnetti* (Afseth, Mo und Mallavia 1995) und in Stämmen von *Proteus* und *Providencia* (Miller, Pabbaraju und Sanderson 2000) nachgewiesen werden. Des weiteren wurde sie in *Rhodopseudomonas* (Dryden und Kaplan 1990), *Agrobacterium* und *Brucella* (Hsu *et al.* 1992), *Rhizobium* (Selenska-Pobell und Evguenieva-Hackenberg 1995), *Actinobacillus* (Haraszthy *et al.* 1992), *Haemophilus* (Song, Forsgren und Janson 1999), *Salmonella* (Burgin *et al.* 1990; Mattatall *et al.* 1996; Pabbaraju, Miller und Sanderson 2000), *Yersinia* (Skurnik und Toivanen 1991),

Campylobacter (Konkel *et al.* 1994), *Helicobacter* (Hurtado *et al.* 1997) und *Leptospira* (Ralph und McClelland 1994) gefunden. Ihre Funktion ist bis jetzt ungeklärt. Ein Vorkommen solcher Intervening Sequenzen in einem Teil der in den Proben enthaltenen Sequenzen würde das Verhältnis der beiden Untereinheiten zugunsten der 16S rRNA beeinflussen.

Eine Extraktion von ribosomaler RNA direkt aus den Ribosomen ist eine weitere Methode, welche im Zuge dieser Arbeit getestet wurde. Sie beruht auf einer von Felske (Felske *et al.* 1996) beschriebenen Methode zur Isolation ribosomaler RNA aus Bodenproben. Diese Methode hat jedoch mehrere Nachteile. Zum einen ist der Einsatz einer großen Menge an Wurzelproben (mindestens 2 g) nötig, um genügend RNA zu isolieren, zum anderen kann man mit dieser Methode ausschließlich ribosomale RNA extrahieren, da hierbei zuerst die intakten Ribosomen mittels Ultrazentrifugation isoliert werden und in einem weiteren Schritt die rRNA aus dem Ribosomen-Komplex freigesetzt wird. Eine Extraktion von mRNA und DNA ist daher nicht möglich. Somit ist diese Methode ungeeignet, einen Vergleich der *nifH* und 16S Diversität anzustellen. Die exemplarisch an der im Gewächshaus auf ungedüngtem Boden gewachsene Reisart *O. longistaminata* durchgeführte Extraktion und die anschließende 16S RT-PCR sowie die Klonierung und Sequenzierung der Klone zeigte, dass ca. 70% aller 16S rRNA Sequenzen mit der Gattung *Azovibrio* clustern.

Da es eher ungewöhnlich war, ausschließlich Proteobakterien innerhalb einer Probe zu detektieren, und nun mit der 16S Sequenz-Datenbank <http://greengenes.llnl.gov/16S/> (DeSantis *et al.* 2003) ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung stand, um die Spezifität von Primern zu überprüfen, wurden die Primer überprüft, welche in diesem Versuch verwendet wurden. Für den 104f Primer konnte gezeigt werden, dass er in seiner ursprünglichen Form zu keiner der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen zu 100% komplementär war. Erst als die letzten 4 Basen am 5'-Ende außer acht gelassen wurden, konnte eine 100%ige Sequenzidentität zu 1,1% der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen beobachtet werden. 98,8% dieser Sequenzen gehörten zu den *Proteobacteria*.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden bestehende Primer überprüft und neue Primer designed.

Interessanterweise konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Qualität der Extrahierten RNA und ihrer Amplifizierbarkeit durch RT-PCR festgestellt werden. Obwohl bei einer Überprüfung der RNA Qualität einer Chang Extraktion keine sichtbaren Banden auf dem Polyacrylamidgel zu beobachten waren, war eine Amplifikation sowohl von 16S rRNA als auch *nifH* mRNA möglich. Im Gegensatz dazu konnte von RNA, welche durch eine Cold/Hot Phenol Extraktion extrahiert wurde und welche die Ribosomalen Banden nach einer Auftrennung auf eine Polyacrylamid Gel aufwies (Abb. 12), zwar ein 16S Genprodukt amplifiziert werden, jedoch war es nicht möglich, auch *nifH* mRNA zu amplifizieren. Daher sollte die Qualität einer RNA Extraktion nicht anhand der auf dem RNA Gel sichtbaren

ribosomalen Banden und deren Verhältnis zueinander beurteilt werden. Ein besseres Kriterium für die Qualität einer RNA Extraktion wäre die Amplifizierbarkeit mittels RT-PCR. Ähnliche Schlussfolgerungen ziehen Palmer und Prediger (Palmer und Prediger 2004) für die Qualitätsbeurteilung von RNA Extraktionen aus Eukaryonten.

4.1.3 Primerdesign

Um die Diversität von Mikroorganismen zu erfassen, stehen eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung. Die Isolation, Kultivierung und anschließende Charakterisierung über physiologische und morphologische Tests der Organismen ist nicht geeignet, um Aussagen über die Komposition mikrobieller Populationen zu treffen, da sich der Hauptteil der Bakterien einer Kultivierung widersetzt (Amann *et al.* 1995). Schätzungen gehen davon aus, dass nur ca. 1% aller Bakterien kultivierbar sind (Tsai und Rochelle 2001). Seit Mitte der 80iger Jahre ist es durch die Verwendung von Techniken, welche auf der Nutzung der Sequenz der rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU) beruhen möglich, Kultur-unabhängige Aussagen über die Komposition mikrobieller Gemeinschaften zu treffen. (Olsen *et al.* 1986; Amann *et al.* 1995). Später wurde diese Art der Untersuchung auch auf Gene ausgeweitet, deren Genprodukt für bestimmte Stoffwechselwege benötigt wird. Ein Beispiel hierfür ist das Nitrogenase Eisen Protein Gen *nifH*, welches bei der Stickstofffixierung expremiert wird (Ueda *et al.* 1995).

Verschiedene Techniken zur Erfassung mikrobieller Diversität wurden entwickelt, welche auf der Auswertung der Sequenz Information der SSU oder am Stoffwechsel beteiligte Gene beruhen. Hierzu zählen neben dem reinen Sequenzieren der Gene unter anderem die Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) und die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) (Amann *et al.* 1995; Muyzer *et al.* 1998; Moeseneder *et al.* 1999). Des weiteren die Single strand conformation polymorphism Analyse (SSCP), sowie die Amplified ribosomal DNA restriction Analyse und die restriction length polymorphism Analyse (Lee, Zo und Kim 1996) (Tiedje *et al.* 1999).

In allen diesen Methoden ist es notwendig, die Gene (oder Genfragmente) zuvor mittels einer PCR Reaktion zu vervielfältigen. Die oben gezeigten Ergebnisse machen eine Überprüfung der publizierten Primer nötig. Dieses ist notwendig, um zu gewährleisten, dass es möglich ist, mit diesen Primern sämtliche Sequenzen in der Datenbank zu erfassen und somit zu gewährleisten, die Diversität innerhalb der Probe so exakt wie möglich wiederzugeben. Ein geeignetes Werkzeug zur Überprüfung von Oligonukleotid Sequenzen auf ihre Fähigkeit, ein breites Spektrum an Sequenzen in den vorhandenen Datenbanken zu erkennen, bietet die bereits oben erwähnte Internetseite <http://greengenes.lnl.gov/16S/> (DeSantis *et al.* 2003). Die Überprüfung zweier sehr häufig verwendeter Primer zur Amplifikation von 16S rRNA (25f und 1492r) (Lane 1991) zeigte, dass mit diesen Primern nur

ein Bruchteil der Sequenzen in den Datenbanken amplifizierbar wären. Beim 1492r Primer lag der Wert bei 46,1%, beim 25f Primer nur bei einem Wert von 3,7%. Dieses, zusammen mit den weiter oben diskutierten Ergebnissen zum 104f Primer macht deutlich, wie wichtig es ist, neue Primer zu designen, um wenigstens potentiell die in der Datenbank schon vertretenen Sequenzen mittels PCR amplifizieren zu können.

Das Designen universeller Primer ist ein Kompromiss zwischen einer möglichst hohen Universalität auf der einen Seite und Primereigenschaften, wie der Annealing Temperatur, dem GC-Gehalt und Primer / Primer Interaktionen auf der anderen Seite (McPherson, Hames und Taylor 1995). Anders als bei Amplifikationen aus Extraktionen von Reinkulturen, wo eine 70%ige Sequenzübereinstimmung für eine erfolgreiche Anlagerung des Primers an das Template ausreicht (Stern und Holland 1993), führt eine geringe Übereinstimmung der Primersequenz zu einigen Sequenzen einer Multi-Template-PCR zu einer Fehleinschätzung der Diversität, da hierbei Sequenzen mit geringerer Sequenzidentität im PCR Produkt unterrepräsentiert sind (Baker, Smith und Cowan 2003).

Durch Modifikationen von bereits publizierten Oligonukleotidsequenzen konnten degenerierte Primer entworfen werden, die zwischen 70% (1501r) und 98% (334f) aller Sequenzen in den Datenbanken binden würden.

Für Archaea und Bacteria wurden separate Primer Paare entworfen. Da sich jedoch nicht ausschließen lässt, dass die für die *Archaea* entworfenen Primer ausschließlich diese Gruppe amplifizieren, kann auf diese Weise keine Aussage darüber getroffen werden, dass es sich bei dem amplifizierten Produkt um eine Sequenz aus *Archaea* handelt. Dieses könnte erst über eine Sequenzierung des PCR Produktes gewährleistet werden. Das gleiche gilt auch im umgekehrten Fall für die *Bacteria* Primer.

Neben den oben erwähnten Methoden ist die rRNA Intergenic Spacer Analysis (RISA) eine weitere Möglichkeit, um die Diversität einer Probe zu ermitteln. Diese Methode, welche auf einer Amplifikation der Region zwischen der 16S und der 23S Gene beruht, macht sich zu Nutzen, dass diese Region bei verschiedenen Bakterien unterschiedliche Längen aufweisen kann. Ein Primerpaar, welches für diese Amplifikation verwendet werden kann, wurde von Normand (Normand *et al.* 1996) publiziert. Der Zeitraum von 8 Jahren zwischen der Publikation und heute macht eine Überprüfung der Primer auf ihre Aktualität unumgänglich. Für den LD-bact-132-aA Primer, welcher in der 23S Region bindet, stellte sich heraus, dass von ihm nur ein relativ geringer Teil der in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen gebunden werden. Erst nach einer Modifikation durch das Einbringen von degenerierten Basen war es möglich, mit diesem Primer einen Großteil aller Sequenzen zu detektieren. Im Fall dieser Arbeit konnte kein Unterschied im Bandenmuster zwischen den Bandenmustern mit dem originalen und dem modifizierten LD-bact-132.aA Primer beobachtet werden (Abb. 18). Der einzige Unterschied lag in der Intensität der beobachteten Banden. Dieser ist darauf

zurückzuführen, dass sich die Konzentration des Primers mit der ursprünglichen Sequenz durch den Einbau der 3 degenerierten Basen um das 64-fache verringert hat.

Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, bei Versuchen zur Ermittlung der Diversität unter Zuhilfenahme der PCR die verwendeten Primer so zu wählen, dass sie möglichst unselektiv das gesamte Spektrum der bekannten Sequenzen amplifizieren würden. Hierdurch wird ein Fehler in der Einschätzung von Diversitäten eliminiert. Jedoch kann immer noch nicht gewährleistet werden, dass jede Sequenz auch gleichmäßig stark amplifiziert wird. Probleme, die hier auftreten, wurden von Wagner (Wagner *et al.* 1994) in zwei Klassen aufgeteilt: PCR Selektion und PCR Drift. Bei der ersten Klasse handelt es sich um Effekte wie die Abhängigkeit der Zusammensetzung von Klonbanken von der eingesetzten Template Konzentration bei der PCR (Chandler *et al.* 1997). Farrelly (Farrelly *et al.* 1995) konnte zeigen, dass die Genomgröße und die Anzahl der 16S Gene einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der PCR Produkte hat. Auch gibt es einige Organismengruppen, deren 16S Gene nicht über eine herkömmliche PCR amplifiziert werden können. So muss zur Amplifikation der 16S von extrem thermophilen Archebakterien der PCR Reaktion 5% (wt/vol) Acetamid zugegeben werden (Reysenbach *et al.* 1992). Bei der zweiten Klasse, der PCR Drift, handelt es sich um nicht reproduzierbare Effekte, welche in der frühen Phase der PCR Reaktion auftreten, während die eingesetzte Nukleinsäure als Template für die Amplifikation fungiert.

Durch den Einbau einer großen Menge an degenerierten Basen können weitere PCR Artefakte auftreten. So kann es zu einem Fehler im Verhältnis des PCR Produktes zur eingesetzten Template Menge kommen (Polz und Cavanaugh 1998). Zudem kann der extensive Einsatz von Degenerierten Basen zu einer Amplifikation anderer Gene oder Sequenzen von nicht gewollten Domänen führen (Baker *et al.* 2003).

Alternativ zum Einbau von degenerierten Basen ist die Verwendung von Inosinen für Primer zur Erfassung eines möglichst großen Spektrums an diversen Bakteriengruppen (Watanabe, Kodama und Harayama 2001). Jedoch kann auch hier der extensive Einbau zu einer Amplifikation von nicht gewünschten Gruppen führen (Baker *et al.* 2003), des weiteren stellt der extrem hohe Preis von Oligonukleotiden mit eingebauten Inosinen einen gravierenden Nachteil dar.

Eine weitere Schwierigkeit, die beim Designen von Primern auftritt, ist die Abhängigkeit der Schmelztemperatur (T_M) von der Art der Nukleinsäurepaaren. Hier konnten große Unterschiede in Abhängigkeit von der Sequenz festgestellt werden. So variiert der T_M eines Nukleinsüredoppelstranges zwischen 54,1°C bei einer DNA/DNA Paarung und 28,7°C bei einer DNA/RNA Paarung (Lesnik und Freier 1995).

Zur Amplifikation des *nifH* Genfragmentes wurden die von Zehr (Zehr und McReynolds 1989) publizierten Primer verwendet. Ein Großteil der in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen

wurden mit diesem Primerpaar amplifiziert, was eine manuelle Überprüfung ergab. Zudem konnte gezeigt werden, dass es mit diesen Primern möglich ist, ein breites Spektrum verschiedener Stickstofffixierender Bakterien zu amplifizieren, wobei es zu keinen Verschiebungen des Verhältnisses von eingesetzter Templatmenge zum erhaltenen PCR Produkt auf Grund etwa unterschiedlichen GC-Gehaltes kommt (Zehr und Capone 1996).

Neben Problemen, welche durch den Einsatz von Primer entstehen, die nicht in der Lage sind, das gesamte Spektrum der in der Probe vertretenen Sequenzen gleichmäßig zu amplifizieren, gibt es weitere Probleme, welche die Erfassung der Diversität behindern. So können während der PCR Reaktion Artefakte entstehen. Es ist bekannt, dass es zu Chimärenbildungen kommen kann (Cariello *et al.* 1991; Choi *et al.* 1994). Des weiteren kann es bei PCR Reaktionen, bei denen das Template stabile Sekundärstrukturen aufweist, zu Deletionsmutanten kommen (Pallansch *et al.* 1990; Cariello *et al.* 1991; Holstege, van der Vliet und Timmers 1994), was besonders auf die ribosomale RNA zutrifft, von der bekannt ist, dass sie intensive Sekundärstrukturen aufweist (Gutell, Larsen und Woese 1994). Für die Taq Polymerase, wie sie in den in dieser Arbeit verwendeten Ready to Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences (Freiburg)) enthalten ist, ist bekannt, dass es bei der Strangsynthese zum Fehleinbau von Nukleotiden kommen kann (Gelfand 1992).

4.1.4 Kalibrierung der *nifH* PCR und RT-PCR für MPN Berechnungen

Zur Quantifizierung der Genexpression in Umweltproben stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Hierzu zählen In situ Hybridisierungstechniken (Amann, Fuchs und Behrens 2001; Silyn-Roberts und Lewis 2001), RNase Protection Assays (Tate *et al.* 1999; Wilderman *et al.* 2001), Northern Blotts (Wouters, Bergman und Janson 2003) und RT-PCR (Hurek *et al.* 2002; Pirnay *et al.* 2002; Alfreider, Vogt und Babel 2003). In situ Hybridisierungstechniken können verwendet werden, um die Expression der untersuchten Gene innerhalb der Probe zu lokalisieren (Hurek, Egner und Reinhold-Hurek 1997), stellt jedoch die komplexeste Methode dar.

Die RT-PCR stellt die Grundlage für eine weitere Reihe von Methoden zur Quantifizierung der Gen-Expression in Umweltproben da. Die reine RT-PCR ist jedoch ungeeignet, da es keinen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Template Konzentration und der Endkonzentration des PCR-Produktes gibt (Freeman, Walker und Vrana 1999). Eine Modifikation stellt die Zugabe eines internen Standards mit bekannter Konzentration (competetive RT-PCR / cRT-PCR) zur eigentlichen RT-PCR Reaktion dar, was es ermöglicht, den Expressionslevel des untersuchten Gens zu ermitteln (Freeman *et al.* 1999). Weitere auf der RT-PCR basierende Methoden sind die Real Time PCR (Klein 2002) und die Microarray Technik (Bodrossy *et al.* 2003; Dennis *et al.* 2003; Leonard *et al.* 2003; Stin *et al.* 2003).

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung nach der bereits im Labor etablierten Methode, der Verdünnungs-RT-PCR, durchgeführt. Hierzu war es nötig, die *nifH* RT-PCR und PCR zu kalibrieren, um das Detektionslimit zu bestimmen. Die RT-PCR wurde zum einen mit Hilfe von total RNA aus *Azoarcus* sp. BH72, zum anderen durch *in vitro* transkribierte *nifH* mRNA geeicht. Letzteres ermöglicht eine Aussage darüber, wie viele Kopien des *nifH* Gens nötig sind, um eine auf dem Agarosegel sichtbare Amplifikation zu erreichen. Das für die Kalibrierung der PCR eingesetzte *nifH* Fragment erlaubt ebenfalls eine Aussage über die Kopienzahl. Zudem wird verhindert, dass die PCR Reaktion durch die hohe Konzentration an genomischer DNA in der Lösung, welche bei einem Einsatz von total DNA gegeben wäre, gehemmt wird. Die statistische Auswertung erfolgte über eine MPN Berechnung, welche mittels des Programms Programm MPN Calculator (Hurley und Roscoe 1983) durchgeführt wurde. Für die RT-PCR von Total RNA ergab sich eine Nachweisgrenze von 130 ± 114 ng. Dieses entspricht einer Bakterienzahl von $3 \cdot 10^7$ Bakterien. Die Detektionsgrenze für die *in vitro* transkribierte *nifH* mRNA lag bei 43 pg. Wenn man davon ausgeht, dass es bei der RT-PCR von total RNA zu keiner Inhibition kommt, bedeutet dies, dass in einer stickstofffixierenden Kultur die *nifH* mRNA ca. 0,03% der gesamt RNA ausmacht, da hier die Nachweisgrenze bei 130 ng lag.

Die Nachweisgrenze bei einer PCR lag um 5 Zehnerpotenzen niedriger als bei der *in vitro* transkribierten mRNA. Hier reichten ca. 37 fg an Template aus. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht einer Basenpaarung von 660 g/mol und einer Länge des *nifH* Gen Fragmentes von ca. 360 bp Basenpaaren entspricht dieses einer Kopienzahl von 93.000, welche ausreicht, um ein sichtbares PCR Produkt zu bekommen.

Um auszuschließen, dass die RT-PCR Reaktionen durch Verunreinigungen im Extrakt gehemmt wurden, wurden neben der Verdünnungsreihe des eigentlichen Extraktes noch zwei weitere Ansätze durchgeführt. Zum einen ein Ansatz, bei welchem dem Extrakt eine bekannte Menge an Total-RNA aus *Azoarcus* sp. BH72 zugegeben wurde und zum anderen eine Verdünnungsreihe, welche ausschließlich die im zweiten Ansatz verwendete Menge an *Azoarcus* sp. BH72 Total RNA enthielt (Abb. 3). Durch einen Vergleich der beiden letzteren Ansätze konnte festgestellt werden, ob ein eventuelles Ausbleiben von Amplifikaten im ersten Ansatz auf im Extrakt enthaltene hemmende Bestandteile zurückzuführen ist, oder ob die eingesetzte Menge unterhalb des Detektionslimits lag.

4.2 Erfassung der Diversität

4.2.1 Erfassung der *nifH* Expressionslevel verschiedener Reisanarten

Mit einer kalibrierten RT-PCR bzw. PCR (siehe 3.1.4) wurden verschiedene Reisanarten auf ihren *nifH* Expressionslevel hin untersucht. Hierbei galt ein besonderes Augenmerk dem Unterschied zwischen Kultur- und Wildreis. Beobachtungen im Labor haben gezeigt, dass

Wildreisarten wie *O. longistaminata* einen um 2 bis 3 Größenordnungen höheren Level an *nifH* mRNA aufwiesen als die Kulturreis-Arten wie z.B. *O. sativa* IR72 (Hurek, unveröffentlichte Daten). Beim Wildreis *O. longistaminata* entsprach der Level an *nifH* mRNA 10^{11} bis 10^{12} stickstofffixierenden *Azoarcus* sp. BH72 Zellen pro Gramm Wurzel-Trockengewicht, während beim Kulturreis *O. sativa* IR72 Werte von 8×10^9 Bakterien pro Gramm Wurzel-Trockengewicht beobachtet werden konnten. Diese Daten konnten im Laufe dieser Arbeit verifiziert werden (Tabelle 9).

Die in den Laborpflanzen nachgewiesene Diskrepanz der *nifH* mRNA Level zwischen Wild- und Kulturreis konnte auch in Pflanzen aus der Umwelt beobachtet werden. Bei Wildreisarten aus Namibia und den Philippinen konnten ähnlich hohe Level an *nifH* mRNA beobachtet werden, wie schon bei der Laborpflanze. Verschiedene Kulturreisarten aus den Philippinen zeigten ähnliche Werte wie die im Labor gewachsene Wildreisart *O. sativa* IR72. Die hier gefundenen Werte für die Zahl der stickstofffixierenden Bakterien pro Gramm Trockengewicht Wurzel überschreiten deutlich die Werte, welche auf Grund von Isolationsexperimenten gefunden wurden. Barraquio (Barraquio *et al.* 1997) konnte in Wurzeln von *O. sativa* IR72 durch Isolationsexperimente ca. 8×10^7 Bakterien nachweisen. Dieser Wert liegt um 2 Zehnerpotenzen niedriger als die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die gleiche Reisart. Ein Grossteil der stickstofffixierenden Bakterien ist daher mit den heutigen Methoden nicht isolierbar. Für *Azoarcus* ist es bekannt, dass er nach Inokulation in Kallargras in ein Stadium verfällt, welches eine Re-Isolation unmöglich macht (Hurek *et al.* 2002).

Da bei diesen Untersuchungen jedoch jeweils nur ein bis maximal 2 Ansätze pro Pflanze durchgeführt wurden, sind die erhaltenen Werte nur Anhaltspunkte und sollten durch weitere Ansätze überprüft werden.

4.2.2 Erfassung der *nifH* Diversität verschiedenen Reisarten

Um einen Überblick zu bekommen, welche Bakterien in den Wurzeln für die Stickstofffixierung verantwortlich sind, wurden die für die Mengenbestimmungen mittels RT-PCR amplifizierten PCR Produkte kloniert und sequenziert. Es ist zu erkennen, dass sich die isolierten Sequenzen mit Ausnahme des Cluster IV über den gesamten phylogenetischen Baum erstrecken (Abb. 27). Dieses deckt sich mit Untersuchungen von Hurek (Hurek *et al.* 2002) an *Oryza minuta*, Engelhard (Engelhard *et al.* 2000) an *O. officinalis* und *O. sativa*, sowie Ueda (Ueda *et al.* 1995) an *O. sativa* L. cv. nihonbare. Besonders hervorzuheben sind die Sequenzen aus der Wurzelprobe von Namibia 5o. Hier konnten nur zwei Gruppen mit jeweils fast identischen Sequenzen beobachtet werden. Beide Gruppen fallen in das Cluster III (Chien und Zinder 1996), welches *nifH* Sequenzen von *Archaea*, *Spirochetes*, Gram Positiven Bakterien, *Proteobacteria* und *Chlorobia* enthält (Abb. 28 A). Sequenzen aus

Wurzelproben von Namibia 2 zeigten bei einer ersten Extraktion ein ähnliches Muster. Hier konnten 36% der Sequenzen in zwei nah verwandten Gruppen im Cluster III und die restlichen 64% in einer Gruppe im Ω -Cluster (Abb. 29) (Hurek *et al.* 2002) gefunden werden. In einer weiteren Extraktion, welche zu einem späteren Zeitpunkt von der gleichen Wurzelprobe durchgeführt wurde, konnten jedoch keine dieser Sequenzen erneut gefunden werden. Zwar lag auch hier der Anteil der Sequenzen im Ω -Cluster bei 66%, jedoch waren diese Sequenzen über den gesamten Ast verteilt. Da jedoch auch der *nifH* mRNA Level bei dieser zweiten Extraktion um 2 Zehnerpotenzen niedriger lag als bei der vorangegangenen, ist nicht klar, ob diese Diskrepanz auf eine inhomogene Verteilung der Bakterien innerhalb der Wurzel oder durch einen Abbau von mRNA zurückzuführen ist, welcher durch das mehrmalige Auftauen und wieder Einfrieren der Probe entstanden sein könnte. Da jedoch die bei der ersten Extraktion detektierten Sequenzen bei der zweiten Extraktion gar nicht mehr auftauchen, ist der Effekt durch eine Degradation der mRNA nur bedingt zu erklären, da es hier zu einem selektiven Abbau der Sequenzen aus der ersten Extraktion gekommen sein müsste.

Mit Ausnahme der beiden Pflanzen *O. longistaminata* Namibia 2 und Namibia 50 wurde in allen untersuchten Pflanzen eine hohe Diversität an stickstofffixierenden Bakterien gefunden. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Anhäufung von Sequenzen im Ω -Cluster (Hurek *et al.* 2002). Mehr als 20% aller in dieser Arbeit isolierten Sequenzen fielen in dieses Cluster. Es enthält bisher nur ein isoliertes Bakterium, welches zu den Delta-Proteobakterien gerechnet wird. Dieses deckt sich mit der Gesamt-Verteilung von *nifH* mRNA Sequenzen, welche zur Zeit in Genebank enthalten sind. Hier fallen 25% aller beschriebenen *nifH* mRNA Sequenzen in dieses Cluster. Dieses unterstreicht die Bedeutung dieses Clusters, für dessen evolutionären Ursprung Hurek (Hurek *et al.* unveröffentlicht) drei unterschiedliche Szenarios beschreibt. Es handelt sich bei diesem Cluster entweder um eine neu phylogenetische Gruppe, welche analog zur 16S rDNA ein „candidate phyla“ darstellt, oder um eine alternative Nitrogenase, wie z.B. die alternative Nitrogenase *anf* (Bishop, Jarlenski und Hetherington 1980). Alternativ könnte es sich um verschiedene nicht näher miteinander verwandte Bakterien handeln, welche dieses *nifH* Gen durch lateralen Gentransfer erhalten haben.

In Wurzeln der Pflanze *O. longistaminata* Big Pot, welche auf stickstofffreiem Boden im Gewächshaus wächst, konnte diese Gruppe von Bakterien auch nachgewiesen werden. Hier machte diese Gruppe zeitweise bis zu 80% aller isolierten Sequenzen aus (Hurek unveröffentlichte Daten). Diese waren jedoch nicht auf eine eng miteinander verwandte Gruppe innerhalb dieses Clusters beschränkt, sondern verteilten sich über den gesamten Ast.

Das Fehlen von Sequenzen im Cluster IV, welches Sequenzen von Archaeen und Spirocheten enthält, deckt sich mit der Tatsache, dass bisher aus diesem Cluster mit Ausnahme von Stickstofffixierern aus Mägen von Termieten nur Sequenzen auf DNA Ebene gefunden wurden. Expressionsdaten aus Gräsern, wie sie in dieser Arbeit ermittelt wurden, liegen zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor.

Frühere Untersuchungen zur Diversität von Stickstofffixierern in Reiswurzeln von Wild- und Kulturreis zeigten eine geringere Diversität in Wurzeln aus Wildreis im Vergleich zu Kulturreis (Engelhard *et al.* 2000). Dieses konnte im Laufe dieser Arbeit nicht verifiziert werden. Für die hier untersuchte Pflanze *O. longistaminata* konnten sowohl Pflanzen mit geringer Diversität (Namibia 2 und Namibia 5o) als auch solche mit hoher Diversität (Namibia 3B, Namibia 4, Big Pot und 22/22a) gefunden werden. Die Diversität ist also nicht Pflanzenspezifisch, sondern hängt auch von externen Faktoren ab. So konnte gezeigt werden, dass die Bodenbeschaffenheit, sowie das Stickstoffangebot Einfluss auf die beobachtete Diversität hat (Tan, Hurek und Reinhold-Hurek 2003).

4.2.3 Erfassung der 16S Diversität verschiedener Reisarten

Um die Diversität auch auf ribosomaler Ebene zu ermitteln, wurde auf die schon oben beschriebene RISA PCR zurückgegriffen. Der hohe Prozentsatz an Sequenzen aus dem Ω -Cluster macht die Pflanze Namibia 2 zu einem interessanten Versuchsobjekt.

Die ursprünglich für die Amplifikation des RISA PCR Produktes verwendete Primerpaarung SD-Bact-1522-b-S-20 / LD-Bact-132-aA liefert zwar das gesamte Intergenic Spacer Genprodukt, jedoch ist so ein Sequenzvergleich mit anderen Organismen nur bedingt möglich, da die Zahl der in der Datenbank enthaltenen Sequenzen dieses Fragmentes nur relativ gering ist. Im Gegensatz dazu liegt von fast allen Organismen die Sequenzinformation des 16S rRNA Gens vor. Dieses eignet sich daher besser, um eine möglichst genaue phylogenetische Einteilung der Sequenz vorzunehmen. Durch die Wahl des neuen forward Primers 1338f konnte neben der intergenic spacer Region noch ein ca. 200 bp langes Fragment der 16S rRNA mit amplifiziert werden. Auf diese Weise war es möglich, zum einen eine Aussage der Diversität aufgrund des Bandenmusters, zum anderen durch eine Sequenzierung der PCR Produkte eine Aussage über die Art der Sequenzen zu erhalten. Ein Vergleich der Bandenmuster der RISA PCR Ansätze mit dem Original und dem neuen Primersatz zeigte, dass in beiden Fällen ein identisches Bandenmuster zu erkennen war. Durch die Koamplifikation der 200 letzten Base aus dem 16S Gen, wurde das Bandenmuster nur dementsprechend verschoben (Abb. 18).

Auf diese Weise wurden mehrere Pflanzen auf ihre Diversität hin untersucht. Die geringste Diversität bezüglich der auf dem Acrylamidgel sichtbaren Banden konnte bei *O. rufipogon* 3c und *O. longistaminata* Namibia 2 nachgewiesen werden. Die Auftrennung der RISA PCR

Produkte zeigte im Fall von *O. rufipogon* 3c nur eine Bande einer Länge von ca. 850 bp, im Fall von *O. longistaminata* Namibia 2 waren zwei Banden auf dem Gel zu erkennen (Abb. 30). Hierbei lagen die Längen der intergenic spacer Fragmente bei ca. 700 bp und 850 bp. Abzüglich der 16S (200bp) und 23S (130 bp) Regionen ergeben sich Gesamtlängen der intergenic spacer Region von 370 bp und 520 bp. Eine Sequenzierung der PCR Produkte dieser drei Banden ergab jeweils eine hohe Diversität innerhalb der 850 bp Bande bei *O. rufipogon* 3c und *O. longistaminata* Namibia 2. In beiden Fällen erstrecken sich die Sequenzen bei einem phylogenetischen Vergleich über den gesamten Baum. Im Falle der 700 bp Bande von *O. longistaminata* Namibia 2 konnte nur eine sehr geringe Diversität beobachtet werden. Hier clusterten 85% der Sequenzen in der Gruppe der *Actinobacteria*, wobei die Sequenzen untereinander näher miteinander verwandt waren als mit dem im Blast ermittelten jeweiligen nächstem Verwandten (Abb. 31).

Ranjard (Ranjard, Brothier und Nazaret 2000) haben gezeigt, dass eine Länge der intergenic spacer Region von 500 bis 600 bp bei vielen verschiedenen eubakteriellen Gruppen vorhanden ist. In diesem Bereich lagen Sequenzen der α -, β - und γ -*Proteobacteria*, grampositive Bakterien mit hohem GC Gehalt sowie *Chlamydiae* und *Cytophagales*. Auch Ranjard konnte bei Untersuchungen eine starke Bande mit einer intergenic spacer Länge von 520 bp nachweisen, unter welcher sich eine hohe Diversität an Bakterien verbarg. Einzelne Phylotypen waren hier mit maximal 15% vertreten.

Eine Aussage über die Diversität nur anhand des Bandenmusters ist daher auch nicht mit 100%iger Genauigkeit möglich, da sich unter einer Bande eine Vielzahl verschiedener Bakterien verbergen können. Dieses gilt besonders für den Bereich einer intergenic spacer Länge zwischen 500 und 600 bp.

Ein Vergleich der hier ermittelten Diversität auf 16S rRNA Ebene zu der zuvor ermittelten *nifH* mRNA Diversität wäre in diesem Fall nicht aussagekräftig, da zum einen die Diversität auf Expressionsebene (*nifH* mRNA) zum anderen auf DNA Ebene (16S rRNA) erfolgte. Zudem müssten die Ergebnisse in mehreren Wiederholungen verifiziert werden, bevor eine aussagekräftige Beurteilung möglich ist.

4.2.4 Abhängigkeit der ermittelten Diversität von der Extraktionsmethode

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden nun die Bandenmuster verschiedener Extraktionen aus der Wurzel von *O. longistaminata* Namibia 2 miteinander verglichen. Da hierbei alle Extraktionen von der selben in flüssigem Stickstoff gemörserten Probe durchgeführt wurden, war es möglich, die Bandenmuster miteinander zu vergleichen. Es konnte so ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in den Bandenmustern auf eine inhomogene Verteilung der Bakterien innerhalb der Wurzel zurückzuführen sind. Um eine möglichst hohe Auflösung bei der Auftrennung der PCR-Produkte zu erreichen, wurden diese auf einem hochauflösenden ReProGel™ High Resolution Gel durchgeführt.

Die hohe Variation der Bandenmuster zwischen den verschiedenen Extraktionsmethoden wie auf Abbildung 34 zu erkennen zeigt, dass es nicht möglich ist, eine endgültige Aussage über die mikrobielle Diversität in einer Probe zu geben, da es zu einer Unterschätzung der Diversität aufgrund der verwendeten Extraktionsmethode kommen kann. Die Chang Extraktion ohne einen Proteinase K Schritt liefert das Bandenmuster mit der höchsten Diversität. Allerdings sind hierbei Fragmente oberhalb einer Länge von 850 bp, wie sie sowohl bei der Chang Proteinase K Extraktion als auch der Cold/Hot Phenol Extraktion zu beobachten waren, nicht mehr vertreten. Neben den oben erwähnten Problemen, die durch die bei der PCR eingesetzten Primer entstehen, ist die Wahl der Extraktionsmethode ein weiteres Kriterium, welches einen Einfluss auf die beobachtete Diversität hat. Im Fall von Graswurzeln, speziell von Reiswurzeln, scheint die Chang Extraktionsmethode die geeignetste Wahl zu sein. Einzig für intergenic spacer Fragmente über einer Länge von 850 bp sollte zusätzlich noch eine weitere Methode verwendet werden. Die Chang Methode eignet sich zudem noch besonders, da sie die einzige Methode darstellte, mit der man in der Lage ist, sowohl mRNA als auch 16S rRNA zu isolieren und es auf Grund der ermittelten Konzentrationen an *nifH* mRNA in einigen Wurzelproben den Anschein hat, dass eine quantitative Extraktion zumindest diesen mRNA Typs mit dieser Methode möglich ist. Auch scheint man mit dieser Methode in der Lage zu sein, RNA zu isolieren, von der eine Amplifikation des intergenic spacer RNA Transcripts möglich ist. Hierzu müssen allerdings die RT-PCR Bedingungen soweit modifiziert werden, dass eine Amplifikation ohne eine Kontamination in der Wasserkontrolle möglich ist.

Die Chang Methode wurde in ähnlicher Form auch zu Untersuchungen der mikrobiellen Diversität von Bodenproben verwendet. Hierbei konnte im Vergleich zu zwei weiteren Methoden festgestellt werden, dass sie die geeignetste Methode für Gen-Expressionsanalysen in Umweltproben darstellt (Sessitsch *et al.* 2002). Zudem konnte bei diesen Untersuchungen ebenfalls festgestellt werden, dass die Wahl der Extraktionsmethode einen Einfluss auf die beobachtete Diversität innerhalb der Probe hat. Die Reinheit der extrahierten Nukleinsäure ist ein wichtiges Kriterium, welches einen Einfluss auf die ermittelte Diversität hat. Dieses konnte anhand von TRFLP (LaMontagne *et al.* 2002), sowie DGGE Analysen (Frostegard *et al.* 1999; Krsek und Wellington 1999) gezeigt werden.

Die in dieser Arbeit ermittelte mikrobielle Diversität in den einzelnen Wurzelproben stellt auf Grund der Vielzahl der in dieser Arbeit geschilderten Faktoren, welche einen Einfluss auf die beobachtete Diversität haben, nur einen kleinen Einblick in die gesamte Diversität dar und kann aus den oben geschilderten Gründen keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

5 Zusammenfassung

Reis stellt die Nahrungsgrundlage für einen Großteil der Weltbevölkerung dar. Der ständig wachsende Bedarf kann nur durch die Züchtung immer ertragreicherer Reissorten und durch intensive Düngung gedeckt werden. Letzteres hat einen stark negativen Effekt auf die Umwelt. Die Nutzung von biologischer Stickstofffixierung zur Deckung des Stickstoffbedarfs, wie es von Rhizobium/Leguminosen Symbiosen bekannt ist, wäre eine sinnvolle Alternative zur chemischen Düngung. Für einige Gräser, darunter auch Reis, wird vermutet, dass sie zumindest einen Teil ihres Stickstoffbedarfs durch biologische Stickstofffixierung erhalten. Mit Ausnahme der Kallargras-Azoarcus-Beziehung ist es allerdings unklar, ob es sich hierbei um eine Symbiose handelt und welche Bakterien für die Stickstofffixierung verantwortlich sind. Aufgrund von Isolationsexperimenten wurden verschiedene Bakterien ermittelt, welche für die biologische Stickstofffixierung verantwortlich sein könnten. Da jedoch ein Großteil der Bakterien unkultivierbar ist und Untersuchungen gezeigt haben, dass ca. 90% der isolierten Bakterien aus Reispflanzen nicht zu den Stickstofffixierern gehören, ist eine Verwendung von Isolations-unabhängigen Methoden zur Ermittlung der aktiven Stickstofffixierer innerhalb der Reiszurzel von Vorteil. Jedoch können auch bei diesen Methoden Fehler auftreten, welche eine Erfassung der gesamten Diversität verhindern.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden daraufhin getestet, möglichst verlustfrei Nucleinsäuren aus Wurzelproben zu extrahieren. Für die Extraktion von mRNA wurde auf die von Dr. Hurek weiterentwickelte „Chang-Methode“ zurückgegriffen. Die ursprünglich hierbei verwendete chemisch, enzymatische Lyse wurde durch eine mechanische Lyse ersetzt, um einen möglichen Abbau der RNA während des Aufschlusses der Bakterien zu minimieren. In dem speziellen Fall von Wurzelproben von *O. longistaminata* Big Pot wurde jedoch kein Unterschied in der Menge der extrahierten RNA zwischen den beiden Lyseverfahren beobachtet. Eine Amplifikation der 16S rRNA war erst nach der Integration einer Proteinase K-Behandlung in den Extraktionsablauf möglich.

Eine Überprüfung der Qualität der extrahierten RNA anhand der Bandenstärken der ribosomalen Untereinheiten nach elektrophoretischer Auftrennung ergaben für die Chang-Extraktion keine sichtbaren Banden. Um RNA zu extrahieren, welche die ribosomalen Banden im theoretischen Verhältnis von 2,7:1 aufweist, wurden verschiedene Methoden getestet. Variationen der Hot Phenol-Extraktion zeigten, dass im allgemeinen die Bande der großen ribosomalen Untereinheit unterrepräsentiert ist. Das theoretische Verhältnis von 2,7:1 konnte bei keiner der verschiedenen Extraktionsmethoden erreicht werden. Dieses ist auf eventuelle Strangbrüche innerhalb der 23S rRNA zurückzuführen. Das Vorhandensein der beiden ribosomalen Banden ist jedoch kein hinreichendes Kriterium, um die Qualität einer RNA-Extraktion zu bestimmen. Die Möglichkeit einer Amplifikation mittels RT-PCR konnte nicht mit der Intensität der Banden korreliert werden.

Zusammenfassung

Bei der Überprüfung der verwendeten 16S und 23S rRNA Primer auf ihre Spezifität hin konnte festgestellt werden, dass keiner der verwendeten Primer in der Lage war, das gesamte Spektrum der in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen zu amplifizieren. Durch das Designen neuer Primer konnten Primerpaare entworfen werden welche zu über 95% der Sequenzen in der Datenbank zu 100% komplementär sind. Hierdurch wurde gewährleistet, dass es zumindest theoretisch möglich ist, fast alle Sequenzen zu amplifizieren.

Durch eine Kalibrierung der *nifH* RT-PCR und PCR konnte das Detektionslimit der beiden Methoden ermittelt werden. Dieses erlaubt die Bestimmung der Zahl der aktiven Stickstofffixierenden Bakterien innerhalb einer Wurzelprobe. Die schon früher beobachtete Diskrepanz der *nifH* Expressionslevels zwischen Kultur- und Wildreis konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Bei Kulturreis lag der *nifH* Expressionslevel um 2 Zehnerpotenzen niedriger als bei Wildreis.

Eine phylogenetische Auswertung der in den Reiswurzeln gefundenen *nifH* mRNA Sequenzen zeigt, dass bei Wildreis sowohl Pflanzen mit einer hohen, als auch solche mit einer niedrigen Diversität gefunden werden. Bemerkenswert war, dass ca. 25% aller isolierten Sequenzen in das Ω -Cluster fielen, von welchem bis jetzt nur ein einzelnes isoliertes Bakterium bekannt ist. Dieses wird zu den Delta-Proteobakterien gerechnet.

Durch die Verwendung eines neuen forward Primers bei der ARISA Methode, welcher ca. 200 Basen innerhalb der 16S rRNA Region liegt, konnte neben dem IGS-Fragment auch ein Bereich der 16S rRNA amplifiziert werden.

Durch eine anschließende Klonierung der Sequenzen, welche sich in den Hauptbanden verbargen, konnte diese anhand ihrer 16s rRNA Information systematisch eingeteilt werden. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich unter einer Bande der IGS-Größe von ca. 520 bp eine Vielzahl an verschiedenen Sequenzen verbarg. Dieses korreliert mit früheren Untersuchungen, welche gezeigt haben, dass IGS Fragmente dieser Länge in einer Vielzahl verschiedene Bakteriengruppen zu finden sind.

Auf diese Weise wurden die Bandenmuster verschiedener Extraktionsmethoden bei einer Wurzelprobe miteinander verglichen. Hierbei konnte beobachtet werden, dass sich die Bandenmuster je nach Wahl der Extraktionsmethode stark voneinander unterscheiden. Extraktionen, welche mittels der Chang-Extraktion durchgeführt wurden, zeigten die größte Diversität.

Dieses zeigt zusammen mit den zuvor geschilderten Ergebnissen, dass die in dieser Arbeit ermittelte Diversität innerhalb der einzelnen Pflanzenwurzeln nur einen kleinen Einblick in die Gesamtdiversität liefern kann und somit keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben darf.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des BIOLOG Afrika Projektes vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) unterstützt.

6 Literatur

- Aerts, R. and F. Berendse (1988). "The effect of increased nutrient availability on vegetation dynamics in wet heathlands." Vegetatio **76**: 63-69.
- Afseth, G., Y. Y. Mo, *et al.* (1995). "Characterization of the 23S and 5S rRNA genes of *Coxiella burnetii* and identification of an intervening sequence within the 23S rRNA gene." J Bacteriol **177**(10): 2946-9.
- Aiba, H., S. Adhya, *et al.* (1981). "Evidence for two functional gal promoters in intact *Escherichia coli* cells." J Biol Chem **256**(22): 11905-10.
- Alfreider, A., C. Vogt, *et al.* (2003). "Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene-contaminated subsurface samples." Appl Environ Microbiol **69**(3): 1372-6.
- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Amann, R., B. M. Fuchs, *et al.* (2001). "The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation." Curr Opin Biotechnol **12**(3): 231-6.
- Amann, R. I., B. J. Binder, *et al.* (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations." Appl Environ Microbiol **56**(6): 1919-25.
- Amann, R. I., W. Ludwig, *et al.* (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol Rev **59**(1): 143-69.
- Ausubel, F., R. Brent, *et al.* (1995). Current protocols in molecular microbiology. New York, John Wiley & Sons.
- Baker, G. C., J. J. Smith, *et al.* (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers." J Microbiol Methods **55**(3): 541-55.
- Barraquio, W. L., L. Revilla, *et al.* (1997). "Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice." Plant and Soil **194**(15-24).
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bishop, P. E., D. M. Jarlenski, *et al.* (1980). "Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7342-6.
- Boddey, R., O. de Oliveira, *et al.* (1995). "Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement." Plant Soil **174**: 195-209.
- Bodrossy, L., N. Stralis-Pavese, *et al.* (2003). "Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs." Environ Microbiol **5**(7): 566-82.
- Burgin, A. B., K. Parodos, *et al.* (1990). "The excision of intervening sequences from *Salmonella* 23S ribosomal RNA." Cell **60**(3): 405-14.
- Burgmann, H., F. Widmer, *et al.* (2003). "mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil." Appl Environ Microbiol **69**(4): 1928-35.
- Cariello, N. F., W. G. Thilly, *et al.* (1991). "Deletion mutagenesis during polymerase chain reaction: dependence on DNA polymerase." Gene **99**(1): 105-8.
- Chandler, D. P., J. K. Fredrickson, *et al.* (1997). "Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries." Mol Ecol **6**(5): 475-82.
- Chang, S., J. Puryear, *et al.* (1993). "A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees." Plant Mol. Biol. Rep **11**: 113-116.
- Chen, G.-J., S. Jin, *et al.* (2000). "An Improved Method for the Isolation of Total RNA from *Malva pusilla* Tissues Infected with *Colletotrichum gloeosporioides*." J. Phytopathology **148**: 57-60.
- Chien, Y. T. and S. H. Zinder (1996). "Cloning, functional organization, transcript studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227." J Bacteriol **178**(1): 143-8.

- Choi, B. K., B. J. Paster, *et al.* (1994). "Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis." Infect Immun **62**(5): 1889-95.
- Classen, A. T., S. I. Boyle, *et al.* (2003). "Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils." FEMS Microbiol. Ecol. **44**: 319-328.
- Corpet, F. (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." Nucleic Acids Res **16**(22): 10881-90.
- Dalton, D. A., S. Kramer, *et al.* (2004). "Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon." FEMS Microbiol. Ecol. **49**: 469-479.
- Dennis, P., E. A. Edwards, *et al.* (2003). "Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays." Appl Environ Microbiol **69**(2): 769-78.
- DeSantis, T. Z., I. Dubosarskiy, *et al.* (2003). "Comprehensive aligned sequence construction for automated design of effective probes (CASCADE-P) using 16S rDNA." Bioinformatics **19**(12): 1461-8.
- Ding, L., K. Williams, *et al.* (2003). "Analysis of plasmid samples on a microchip." Anal Biochem **316**(1): 92-102.
- Dryden, S. C. and S. Kaplan (1990). "Localization and structural analysis of the ribosomal RNA operons of *Rhodobacter sphaeroides*." Nucleic Acids Res **18**(24): 7267-77.
- Engelhard, M., T. Hurek, *et al.* (2000). "Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races." Environ Microbiol **2**(2): 131-41.
- Fang, G., S. Hammar, *et al.* (1992). "A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA." Biotechniques **13**(1): 52-4, 56.
- Farrelly, V., F. A. Rainey, *et al.* (1995). "Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species." Appl Environ Microbiol **61**(7): 2798-801.
- Felske, A., B. Engelen, *et al.* (1996). "Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis." Appl Environ Microbiol **62**(11): 4162-7.
- Fisher, M. M. and E. W. Triplett (1999). "Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4630-6.
- Freeman, W. M., S. J. Walker, *et al.* (1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential." Biotechniques **26**(1): 112-22, 124-5.
- Frostegard, A., S. Courtois, *et al.* (1999). "Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils." Appl Environ Microbiol **65**(12): 5409-20.
- Galloway, J., W. Schlesinger, *et al.* (1995). "Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response." Global Biogeochem. Cycles **9**(2): 235-252.
- Garland, J. L. (1996). "Patterns of potential C source utilization by rhizosphere communities." Soil Biol. Biochem. **28**: 223-230.
- Garland, J. L., Mills, A.L. (1991). "Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization." Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2351-2359.
- Gelfand, D. H. (1992). Taq DNA polymerase, PCR technology. Principles and Applications for DNA Amplification. H. A. Erlich. New York, Freeman and Company: 17-22.
- Gutell, R. R., N. Larsen, *et al.* (1994). "Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective." Microbiol Rev **58**(1): 10-26.
- Haraszthy, V. I., G. J. Sunday, *et al.* (1992). "Identification and analysis of the gap region in the 23S ribosomal RNA from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." J Dent Res **71**(9): 1561-8.
- Henikoff, S. and J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10915-9.
- Holstege, F. C., P. C. van der Vliet, *et al.* (1994). "Instability of human TATA-binding protein CAG triplet repeats during amplification by PCR." Biochim Biophys Acta **1219**(1): 157-9.

- Hsu, D., Y. C. Zee, *et al.* (1992). "Diversity of cleavage patterns of Salmonella 23S rRNA." J Gen Microbiol **138 (Pt 1)**: 199-203.
- Hurek, T., T. Egner, *et al.* (1997). "Divergence in nitrogenases of Azoarcus spp., Proteobacteria of the beta subclass." J Bacteriol **179(13)**: 4172-8.
- Hurek, T., L. L. Handley, *et al.* (2002). "Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state." Mol Plant Microbe Interact **15(3)**: 233-42.
- Hurek, T., B. Reinhold, *et al.* (1987). "Root-zone-specific oxygen tolerance of Azospirillum spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass." Appl. Environ. Microbiol. **53**: 163-169.
- Hurek, T., B. Wagner, *et al.* (1997). "Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated Azoarcus species by PCR-based genomic fingerprints." Appl Environ Microbiol **63(11)**: 4331-9.
- Hurley, M. A. and M. E. Roscoe (1983). "Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series." J. of Appl. Bacteriology **55**: 159-164.
- Hurtado, A., J. P. Clewley, *et al.* (1997). "Sequence similarities between large subunit ribosomal RNA gene intervening sequences from different Helicobacter species." Gene **194(1)**: 69-75.
- Ishikawa, H. (1977). "Evolution of ribosomal RNA." Comp Biochem Physiol B **58(1)**: 1-7.
- James, E. (2000). "Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis." Field Crops Res. **65**: 197-209.
- James, E. K., G. Gyaneshwar, *et al.* (2000). Endophytic diazotrophs associated with rice. The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. J. K. Ladha and P. N. Reddy. Manila, International Rice Research Institute.
- Katterman, F. R. and V. I. Shattuck (1983). "An effective method of DNA isolation from the mature leaves of Gossypium species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins." Prep Biochem **13(4)**: 347-59.
- Klein, D. (2002). "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations." Trends Mol Med **8(6)**: 257-60.
- Konkel, M. E., R. T. Marconi, *et al.* (1994). "Identification and characterization of an intervening sequence within the 23S ribosomal RNA genes of Campylobacter jejuni." Mol Microbiol **14(2)**: 235-41.
- Krsek, M. and E. M. Wellington (1999). "Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil." J Microbiol Methods **39(1)**: 1-16.
- Kumar, S., K. Tamura, *et al.* (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Tempe, Arizona, USA, Arizona State University.
- LaMontagne, M. G., F. C. Michel, Jr., *et al.* (2002). "Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis." J Microbiol Methods **49(3)**: 255-64.
- Lane, D. (1991). 16S/23S RNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, UK., John Wiley & Sons: 115-176.
- Lee, D. H., Y. G. Zo, *et al.* (1996). "Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism." Appl Environ Microbiol **62(9)**: 3112-20.
- Leff, L. G., J. R. Dana, *et al.* (1995). "Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments." Appl Environ Microbiol **61(3)**: 1141-3.
- Leonard, E. E., 2nd, T. Takata, *et al.* (2003). "Use of an open-reading frame-specific Campylobacter jejuni DNA microarray as a new genotyping tool for studying epidemiologically related isolates." J Infect Dis **187(4)**: 691-4.
- Lesnik, E. A. and S. M. Freier (1995). "Relative thermodynamic stability of DNA, RNA, and DNA:RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure." Biochemistry **34(34)**: 10807-15.
- Liesack, W., H. Weyland, *et al.* (1991). "Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria." Microb. Ecol. **21**: 191-198.

- Liu, W. T., T. L. Marsh, *et al.* (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA." *Appl Environ Microbiol* **63**(11): 4516-22.
- Loomis, W. D. (1974). "Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles." *Methods Enzymol* **31**(Pt A): 528-44.
- Luo, X. Z. and S. E. Stevens, Jr. (1997). "Isolation of full-length RNA from a thermophilic cyanobacterium." *Biotechniques* **23**(5): 904-6, 908, 910.
- Malik, K. A., B. Rakhshanda, *et al.* (1997). "Association of nitrogen-fixing plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice." *Plant Soil* **194**: 37-44.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, *et al.* (2001). "DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods." *Appl Environ Microbiol* **67**(5): 2354-9.
- Mattatall, N. R., D. A. Daines, *et al.* (1996). "Salmonella typhi contains identical intervening sequences in all seven *rrl* genes." *J Bacteriol* **178**(17): 5323-6.
- McPherson, M. J., B. D. Hames, *et al.* (1995). *PCR II*, Oxford Univ. Press, UK.
- Miller, W. L., K. Pabbaraju, *et al.* (2000). "Fragmentation of 23S rRNA in strains of *Proteus* and *Providencia* results from intervening sequences in the *rrn* (rRNA) genes." *J Bacteriol* **182**(4): 1109-17.
- Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, *et al.* (1999). "Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis." *Appl Environ Microbiol* **65**(8): 3518-25.
- Muyzer, G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." *Curr Opin Microbiol* **2**(3): 317-22.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, *et al.* (1998). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular Microbial Ecology Manual*. A. Akkermans, J. van Elsas and F. de Bruijn. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-27.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, *et al.* (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." *Appl Environ Microbiol* **59**(3): 695-700.
- Muyzer, G. and K. Smalla (1999). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology." *Antonie van Leeuwenhoek* **73**(127-141).
- Mylona, P., K. Pawlowski, *et al.* (1995). "Symbiotic Nitrogen Fixation." *Plant Cell* **7**(7): 869-885.
- Nicholas, K. and H. J. Nicholas (1997). "GeneDoc: a tool for editing and annotation multiple sequence alignments. Distributed by the authors (www.cris.com/~ketchup/genedoc.html)."
- Noda, S., M. Ohkuma, *et al.* (1999). "Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*." *Appl Environ Microbiol* **65**(11): 4935-42.
- Normand, P., C. Ponsonnet, *et al.* (1996). ITS analysis of procaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual*. D. Akkermans, J. van Elsas and F. de Bruijn. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 1 - 12.
- Nubel, U., B. Engelen, *et al.* (1996). "Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis." *J Bacteriol* **178**(19): 5636-43.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, *et al.* (1986). "Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach." *Annu Rev Microbiol* **40**: 337-65.
- Orita, M., Y. Suzuki, *et al.* (1989). "Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction." *Genomics* **5**(4): 874-9.
- Pabbaraju, K., W. L. Miller, *et al.* (2000). "Distribution of intervening sequences in the genes for 23S rRNA and rRNA fragmentation among strains of the *Salmonella* reference collection B (SARB) and SARC sets." *J Bacteriol* **182**(7): 1923-9.
- Pallansch, L., H. Beswick, *et al.* (1990). "Use of an RNA folding algorithm to choose regions for amplification by the polymerase chain reaction." *Anal Biochem* **185**(1): 57-62.

- Palmer, M. and E. Prediger (2004). "Assessing RNA Quality." Ambion TechNotes **11**(1).
- Patriquin, D. G., J. Döbereiner, *et al.* (1983). "Sites and processes of association between diazotrophs and grasses." Can. J. Microbiol. **29**: 900-915.
- Peters, S., S. Koschinsky, *et al.* (2000). "Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes." Appl Environ Microbiol **66**(3): 930-6.
- Pirnay, J. P., D. De Vos, *et al.* (2002). "Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates." Environ Microbiol **4**(12): 872-82.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." Appl Environ Microbiol **64**(10): 3724-30.
- Pronk, L. M. and K. E. Sanderson (2001). "Intervening sequences in rrl genes and fragmentation of 23S rRNA in genera of the family Enterobacteriaceae." J Bacteriol **183**(19): 5782-7.
- Ralph, D. and M. McClelland (1994). "Phylogenetic evidence for horizontal transfer of an intervening sequence between species in a spirochete genus." J Bacteriol **176**(19): 5982-7.
- Ranjard, L., E. Brothier, *et al.* (2000). "Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking." Appl Environ Microbiol **66**(12): 5334-9.
- Reilly, K. and G. T. Attwood (1998). "Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR." Appl Environ Microbiol **64**(3): 907-13.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, *et al.* (1986). "Close association of Azospirillum and diazotroph rods with different root zones of Kallar grass." Appl. Environ. Microbiol. **52**: 520-526.
- Reysenbach, A. L., L. J. Giver, *et al.* (1992). "Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction." Appl Environ Microbiol **58**(10): 3417-8.
- Salzman, R., T. Fujita, *et al.* (1999). "An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates." Plant Molecular Biology Reporter **17**: 11-17.
- Sambrook, J., E. Fritsch, *et al.* (1989). Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schneiderbauer, A., H. Sandermann, Jr., *et al.* (1991). "Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds." Anal Biochem **197**(1): 91-5.
- Selenska-Pobell, S. and E. Evguenieva-Hackenberg (1995). "Fragmentations of the large-subunit rRNA in the family Rhizobiaceae." J Bacteriol **177**(23): 6993-8.
- Sessitsch, A., S. Gyamfi, *et al.* (2002). "RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols." J Microbiol Methods **51**(2): 171-9.
- Sevilla, M., R. H. Burris, *et al.* (2001). "Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutants strains." Mol Plant Microbe Interact **14**(3): 358-66.
- Siciliano, S. D., Germida, J.J. (1998). "Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that *Pseudomonad* inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*." Soil Biol. Biochem. **30**: 1717-1723.
- Silyn-Roberts, G. and G. Lewis (2001). "In situ analysis of *Nitrosomonas* spp. in wastewater treatment wetland biofilms." Water Res **35**(11): 2731-9.
- Sitte, P., E. Weiler, *et al.* (2002). Strasburger - Lehrbuch der Botanik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Skurnik, M. and P. Toivanen (1991). "Intervening sequences (IVSs) in the 23S ribosomal RNA genes of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. The IVSs in *Y. enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* have a common origin." Mol Microbiol **5**(3): 585-93.
- Song, X. M., A. Forsgren, *et al.* (1999). "Fragmentation heterogeneity of 23S ribosomal RNA in *Haemophilus* species." Gene **230**(2): 287-93.

- Stern, C. D. and P. W. H. Holland (1993). *Essential Developmental Biology*. Oxford, Oxford Univ. Press: 324 ff.
- Stin, O. C., A. Carnahan, *et al.* (2003). "Characterization of microbial communities from coastal waters using microarrays." *Environ Monit Assess* **81**(1-3): 327-36.
- Stoltzfus, J. R., R. So, *et al.* (1997). "Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen." *Plant Soil* **194**: 25-36.
- Tabacchioni, S., L. Chiarini, *et al.* (2000). "Bias Caused by Using Different Isolation Media for Assessing the Genetic Diversity of a Natural Microbial Population." *Microb Ecol* **40**(3): 169-176.
- Tan, Z., T. Hurek, *et al.* (2003). "Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice." *Environ Microbiol* **5**(10): 1009-15.
- Tate, R., A. Riccio, *et al.* (1999). "The Rhizobium etli metZ gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of Phaseolus vulgaris." *Mol Plant Microbe Interact* **12**(1): 24-34.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, *et al.* (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-82.
- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, *et al.* (1999). "Opening the black box of soil microbial diversity." *Appl. Soil Ecology* **13**: 109-122.
- Trevors, J. T. (1998). "Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils." *Water Air Soil Pollut.* **101**: 45-67.
- Triplett, E. W. (1996). "Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots." *Plant Soil* **186**: 29-38.
- Tsai, Y. and P. Rochelle (2001). *Extraction of Nucleic Acids from Environmental Samples. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. P. Rochelle. Wymondham, UK., Horizon Scientific Press,.
- Ueda, T., Y. Suga, *et al.* (1995). "Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences." *J Bacteriol* **177**(5): 1414-7.
- von Wintzingerode, F., U. B. Gobel, *et al.* (1997). "Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis." *FEMS Microbiol Rev* **21**(3): 213-29.
- Wagner, A., N. Blackstone, *et al.* (1994). "Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift." *Syst. Biol.* **43**: 250-261.
- Watanabe, K., Y. Kodama, *et al.* (2001). "Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting." *J Microbiol Methods* **44**(3): 253-62.
- Wilderman, P. J., A. I. Vasil, *et al.* (2001). "Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in Pseudomonas aeruginosa." *Infect Immun* **69**(9): 5385-94.
- Winkler, M. E. (1979). "Ribosomal ribonucleic acid isolated from Salmonella typhimurium: absence of the intact 23S species." *J Bacteriol* **139**(3): 842-9.
- Wouters, J., B. Bergman, *et al.* (2003). "Cloning and expression of a putative cyclodextrin glucosyltransferase from the symbiotically competent cyanobacterium Nostoc sp. PCC 9229." *FEMS Microbiol Lett* **219**(2): 181-5.
- Yanni, Y. G., R. Y. Rizk, *et al.* (1997). "Natural endophytic associations between Rhizobium leguminosarum bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth." *Plant Soil* **194**: 99-114.
- Zehr, J. P. and D. G. Capone (1996). "Problems and Promises of Assaying the Genetic Potential for Nitrogen Fixation in the Marine Environment." *Microb Ecol* **32**(3): 263-81.
- Zehr, J. P. and L. A. McReynolds (1989). "Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium Trichodesmium thiebautii." *Appl Environ Microbiol* **55**(10): 2522-6.

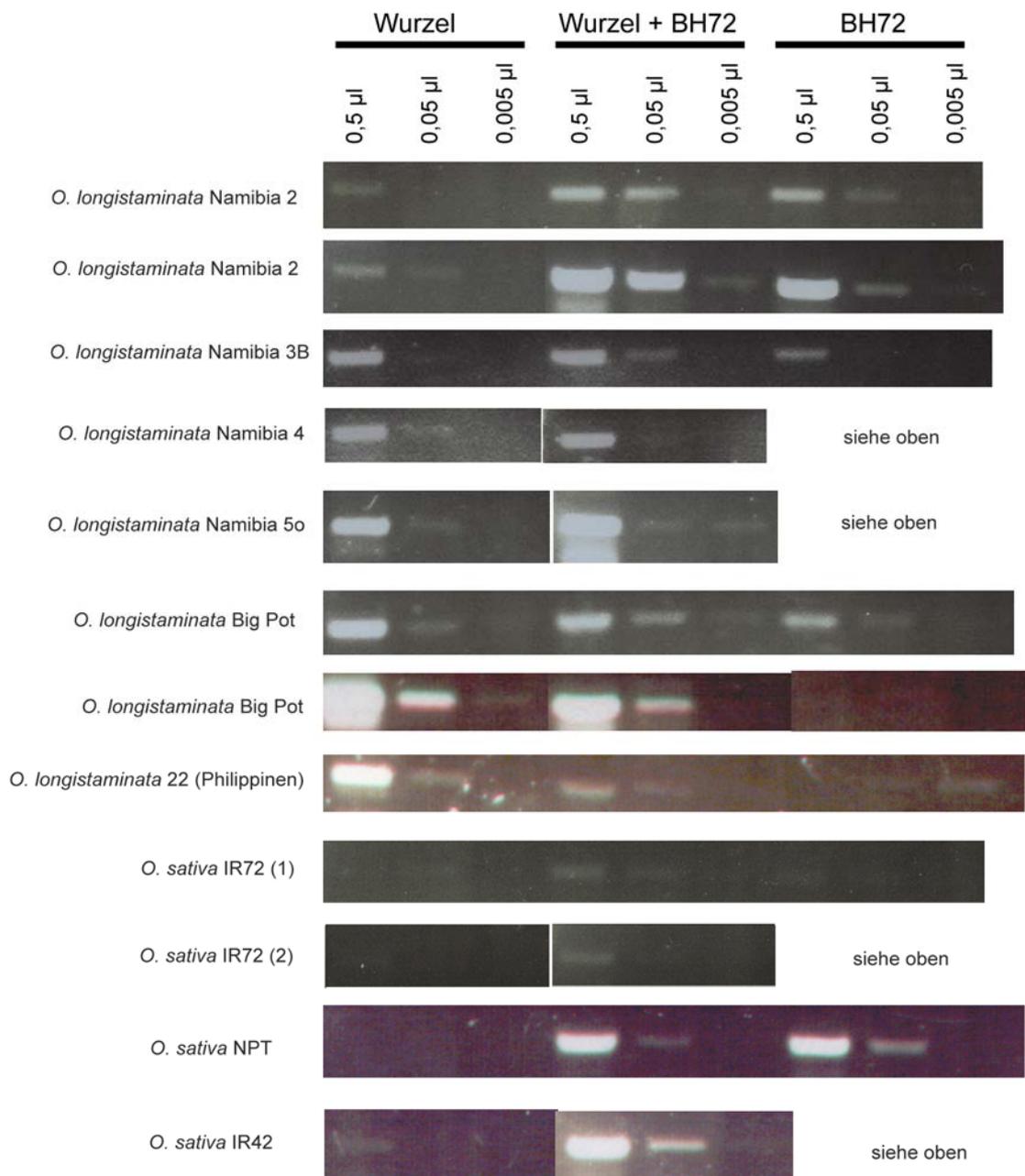
Literatur

Zelles, L. (1999). "Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review." Biol. Fertil. Soils **29**: 111-129.

7 Anhang

7.1 Ermittlung des *nifH* Expressionslevels

Gelbilder der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Quantifikationen der *nifH* Expressionslevel in verschiedenen Reiswurzeln. Es wurden immer 700 mg Wurzel-Frischgewicht eingesetzt und die RNA nach Extraktion und DNase Behandlung in 15 µl H₂O aufgenommen. Daher sind alle Werte direkt miteinander vergleichbar. Aufgrund des in dieser Arbeit ermittelten Detektionslimits der *nifH* RT-PCR kann aus diesen Werten direkt auf die Zahl der Stickstofffixierer pro Gramm Wurzel-Trockengewicht geschlossen werden.



7.2 Accession-Nummern der ermittelten *nifH* mRNA Sequenzen

Sämtliche in dieser Arbeit ermittelten *nifH* Sequenzen wurden an die NBI Datenbank übermittelt und in folge dessen mit einer Accession-Nummer versehen. Nachstehende Tabelle enthält die in dieser Arbeit verwendeten Namen der Sequenzen mit der jeweiligen dazugehörigen Accession-Nummer.

Verwendeter Name	Accession-Nummer
A2(2)5oNBt	AY231478
A6(4)2NB	AY181004
A8(1)BP	AY180976
A9(1)BP	AY180977
A9(4)2NB	AY181005
B1(1)Phil	AY231492
B1(4)2NB	AY181006
B1_72(1)P	AY180999
B11(1)BP	AY180978
B12(1)5oNBt	AY231479
B2_72(1)P	AY181000
B3(1)5oNBt	AY231480
B4(4)7NB	AY181015
B5(1)BP	AY180979
B9(1)BP	AY180980
C1(4)7NB	AY181016
C2(2)5oNBt	AY231481
C3(1)2NB	AY181007
C3(1)BP	AY180981
C3(4)7NB	AY181017
C5(1)5oNBt	AY231482
C6(4)2NB	AY181008
D1(1)Phil	AY231493
D1(2)5oNBt	AY231483
D1_72(1)P	AY181001
D10(4)2NB	AY181009
D2(1)BP	AY180982
D2(1)Phil	AY231494
D5(1)BP	AY180983
D6(1)BP	AY180984
E1(2)5oNBt	AY231484
E1_72(1)P	AY181002
E11(1)BP	AY180985
E12(4)2NB	AY181010
E2(1)BP	AY180986
E2(1)Phil	AY231495

Verwendeter Name	Accession-Nummer
E2(4)7NB	AY181018
E3(1)BP	AY180987
E4(1)Phil	AY231496
E5(4)7NB	AY181019
E7(1)BP	AY180988
E8(1)5oNBt	AY231485
E9(1)5oNBt	AY231486
E9(1)BP	AY180989
F1(1)5oNBt	AY231487
F2(1)BP	AY180990
F2(2)5oNBt	AY231488
F3(1)2NB	AY181011
F5(4)7NB	AY181020
F6(4)7NB	AY181021
F7(1)BP	AY180991
G1(1)BP	AY180992
G1(4)7NB	AY181022
G1_72(1)P	AY181003
G11(4)2NB	AY181012
G2(1)BP	AY180993
G2(1)Phil	AY231497
G4(1)2NB	AY181013
G4(1)BP	AY180994
G4(1)Phil	AY231498
G5(1)5oNBt	AY231489
G5(2)5oNBt	AY231490
G6(4)7NB	AY181023
G7(1)BP	AY180995
G8(1)BP	AY180996
H1(1)BP	AY180997
H2(1)Phil	AY231499
H3(1)Phil	AY231500
H4(1)5oNBt	AY231491
H9(1)BP	AY180998
H9(4)2NB	AY181014

8 Danksagung

Frau Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Versuchspflanzen.

Herrn Dr. Thomas Hurek möchte ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und die praktischen Ratschläge zur Organisation und Durchführung der Versuche danken.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Amann danke ich für die Übernahme der Aufgabe des Zweitgutachters.

Herrn Dr. Brar vom Internationalen Rice Research Institut (Los Banos, Philippinen) danke ich für die Bereitstellung einiger der Reispflanzen.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe der Allgemeinen Mikrobiologie für die stete Unterstützung und die unglaublich angenehme Arbeitsatmosphäre.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Erfassung der mikrobiellen Diversität in verschiedenen Reiserassen und Varietäten“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Bremen, den