

---

**Interaktionen endophytischer Bakterien mit ihren  
Wirtspflanzen auf zellulärer Ebene und  
deren Einfluß auf die Phytopathogenantwort**

---

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

**Doktor der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Kai Kalippke  
Geboren am 24.06.1997 in Soltau

Hannover, 29. März 2000

Referent: Prof. Dr. rer. hort. I. Fendrik

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. H. Kirchhoff

Tag der Promotion: 09.06.2000

**Institut für Biophysik  
der  
Universität Hannover**

---

**Interaktionen endophytischer Bakterien mit ihren  
Wirtspflanzen auf zellulärer Ebene und  
deren Einfluß auf die Phytopathogenantwort**

---

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Kai Kalippke

Hannover, 29. März 2000

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. rer. hort. Fendrik für die Überlassung des Themas, die Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft, sowie für die Unterstützung in allen Bereichen und das angenehme Arbeitsklima danken.

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Kirchhoff für die Übernahme des Korreferats meiner Doktorarbeit und die Begleitung durch mein gesamtes Studium.

Ich danke Prof. Dr. Del Gallo für die Unterstützung bei der Initiation der Kalluskulturen und ihre Anleitung während meiner Italienaufenthalte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kolb und PD Dr. Marten für die Kontakte zu externen Arbeitsgruppen mit denen ich im Rahmen dieser Arbeit kooperiert habe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Berger und seiner Arbeitsgruppe für die schnelle und gute Zusammenarbeit bei der Umsetzung der IAA-Analysen.

Ich danke Dr. Niehaus und seiner Arbeitsgruppe für die Einführungen in die Lumineszenzmessungen und die nicht so selbstverständliche Kooperations- und Diskussionsbereitschaft in diesem Themenbereich.

Ich danke Annette Bussmann und dem Institut für Peptidforschung für die spontane Hilfe bei den Calcium-Analysen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, den „N-Fixern“: bei Dr. Tina, von deren Erfahrungen ich bei der Kreation dieser Arbeit profitieren darf; bei Rüdiger und meiner Ex-Diplomandin Sandra, deren Teamwork mittlerweile rund um die Uhr geht; meinen Ex-Diplomanden Matthias D., mit dem ich so manche Nachtschichten in Hannover gemacht habe; meinem Diplomanden Matthias W., der immer weiß, wo etwas Gutes los ist; unserer TA Heidi, die die gute Seele der Arbeitsgruppe ist und ich mich einfach freue, wenn wir zusammen arbeiten.

Ich danke Fabio Bueno dos Reis Jr., meinem besten Freund in Brasilien, der mich während meines Forschungsaufenthaltes in Seropedica betreut hat und mich zum Fan von Vascodagama, Rio de Janeiro gemacht hat.

Ein ganz spezielles „Danke schön“ an meinen Mitbewohner, Computerexperten und Meß- und Regeltechniker Michael Bethke, inzwischen Dipl.-Ing. (FH), der viel Freizeit geopfert hat, um diese Arbeit zu verwirklichen. Ich weiß noch nicht, wie und ob ich das irgendwann wieder gut machen kann!?

Ich danke Stefan Johannsen, ohne den ich heute wahrscheinlich noch nicht einmal mein Diplom gemacht hätte und Andrea, die mich viele Jahre während dieses Studiums unterstützt und begleitet hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die verantwortlich dafür sind, wie und was ich geworden bin. Die Sicherheit, daß ihr immer für mich da seid, ist wertvoller als alles andere. Danke!!!

Gleicher Dank gebührt meinem Bruder, Frank, der häufig mehr an mich geglaubt hat als ich selber und immer weiß, daß und wie er mich zu neuen Leistungen anspornen muß. Es gibt keinen besseren!!!

## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Kai Kalippke

Hannover, März 2000

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es einen Chemostaten zu entwickeln, in dem Pflanzensuspensionen unter kontinuierlichen Bedingungen in Reinkultur und in Mischkultur mit endophytischen Bakterien kultiviert werden können. Die positiven Effekte von Endophyten bezüglich der Verbesserung des Wachstums ihrer Wirtspflanzen, die bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt wurden, sollten auf zellulärem Level analysiert werden. Speziell die Rolle des Phytoeffektors IAA und des Stickstoffs, der vom diazotrophen Endophyten fixiert wurde, wurden untersucht. Für die Experimente wurden Kallus- und Suspensionskulturen der Süßkartoffel etabliert.

Diese Fragestellungen konnten durch die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit umfassend beantwortet werden.

Der Multiple Chemostat ist durch die Weiterentwicklungen in ein Fermentersystem umgewandelt worden, in dem pflanzliche Zellsuspensionen unter kontinuierlichen Bedingungen erfolgreich kultiviert werden können. In dieser Einheit aus fünf Chemostaten wurden die Interaktionen zwischen den Suspensionskulturen der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas* (L.) Lam und ihrem natürlichen diazotrophen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf zellulärer Ebene untersucht.

In diesen Experimenten wurde ein verbessertes Wachstum der Pflanzenzellen in Gegenwart des Endophyten bilanziert, das sich in einer Zunahme der Wachstumsrate, einer Erhöhung der Zellzahlen und der pflanzlichen Zellmasse in den Mischkulturen manifestierte. Der positive Einfluß von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf die Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam konnte auf eine Steigerung der Nitrogenaseaktivität und damit der Stickstofffixierung zurückgeführt werden, von der die Pflanzenzellen profitierten. Dieses wurde anhand der Isotopenverdünnungsmethode mit dem Isotop  $^{15}\text{N}$  nachgewiesen. Ein weiterer Faktor, der die Wachstumssteigerung der Pflanzenzellen positiv beeinflusste, war die erhöhte Konzentration des Phytoeffektors IAA in den

Mischkulturen. Der Gehalt in diesen Ansätzen lag um das Vierfache höher als in den korrespondierenden Reinkulturen.

Der Endophyt wurde unter kontinuierlichen Bedingungen durch die Coexistenz mit den Süßkartoffelzellen nicht meßbar beeinflußt. Unter statischen Bedingungen hingegen konnten bis zum 20. Kulturtag  $10^7$  CFU/ml aus den Mischkulturen isoliert werden, während in den Reinkulturen zum gleichen Zeitpunkt keine vitalen Bakterien gefunden wurden.

Die Etablierung einer stabilen Zellzahl der Bakterien in der Mischkultur war möglich, weil eine Phytopathogenantwort der Süßkartoffel auf den Endophyten ausblieb. Diese Toleranz gegenüber dem Bakterium beruhte auf einem Erkennungsmechanismus, der wahrscheinlich eine schnelle, effektive Signaltransduktionskette initiiert, die die Pathogenantwort in den Pflanzenzellen inhibiert. Diese Ergebnisse wurden durch Analysen einer durch einen Hefeelicitator vorinduzierten Phytopathogenantwort bestätigt, die nach Zugabe von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 reprimiert wurde. Die Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam entwickelten nicht nur keine Pathogenantwort nach Zugabe von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, sondern beendeten sogar eine zuvor induzierte Phytopathogenantwort.

Keywords: Pflanzenzellsuspension, diazotropher Endophyt, Chemostat

## Abstract

The aim of this work has been to develop a chemostat in which plant cell suspension can be cultivated under continuous conditions in pure and in mixed culture with endophytic bacteria. The positive effects of endophytes regarding the promotion of the growth of their host plant, that has been shown in various experiments, should be analysed on a cellular level. Especially the role of the phytoeffector IAA and the nitrogen that was fixed by the diazotroph endophyte have been examined. For the experiments callus- and suspension-cultures of the sweet potato have been established.

The multiple chemostat was developed into a fermentation system, in which suspended plant cells could successfully be cultivated under continuous conditions. Inside this unit of five chemostats, the interactions between plant cell cultures of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam, and its naturally occurring endophytic, diazotroph bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, was examined on a cellular level.

During these experiments the growth of the plant cells was improved in presence of the endophyte. This could be measured by an increase of the growth rate, of the cell numbers and of the biomass of the plant cells. The positive influence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 on the development of the cells of *Ipomoea batatas* (L.) Lam is due to the fact that the activity of nitrogenase was enhanced in mixed cultures. It can be proved by the <sup>15</sup>N isotope dilution technique that the plant cells benefited from the higher rate of nitrogen fixation of the bacteria. Another reason for the positive influence on the growth of the plant cells was the higher concentration of IAA production. The phytohormone in the mixed culture was found more than four times higher in comparison to the corresponding pure cultures.

The endophyte was not measurably influenced by the coexistence with the cells of the sweet potato under continuous conditions. However, in the batch culture, 10<sup>7</sup> cfu/ml of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 could be isolated

out of the mixed culture after 20 days. As well, no viable bacteria cells were found inside the pure culture.

The establishment of stable numbers of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in the mixed culture was possible because the cells of the sweet potato did not develop a pathogene response against the endophyte. This tolerance against the bacterium was based on a mechanism of recognition which probably initiated a fast and effective signal chain reaction that suppressed the pathogene response by the plant cells. These results were confirmed by the analysis of a preinduced phytopathogene reaction after the addition of an elicitor from a yeast. The cells of *Ipomoea batatas* (L.) Lam did not only refrain from a pathogene response after the application of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 but also stopped an already induced phytopathogene reaction.

Keywords: plant cell cultures, diazotrophic endophyte, chemostat

# I Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	VII
Abstract .....	IX
I Inhaltsverzeichnis .....	XI
II Abkürzungen .....	XIX
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ipomoea batatas (L.) Lam.....	2
1.1.1 Die Spezies .....	2
1.1.2 Zellkulturen.....	2
1.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 .....	3
1.3 Chemostat.....	4
1.4 Aufgabenstellung.....	5
<b>2 Medien und Methoden.....</b>	<b>6</b>
2.1 Medien und Chemikalien .....	6
2.1.1 Medium (MSHe) nach Murashige and Skoog und Heller .....	6
2.1.2 LGI-P-Medium.....	7
2.1.3 Vorinkubationsmedium für die Lumineszenzmessungen (Vim) .....	8
2.1.4 Phosphat-gepufferte-Saline (PBS) .....	9
2.1.5 Nutrient Agar (Merck 5450) NA .....	9
2.1.6 Reagenzien für die Vitalitätsbestimmung der Pflanzenzellen .....	9
2.1.7 Reagenzien für die Herstellung des Hefeelicitors.....	9
2.1.8 Proteinbestimmung .....	10
2.1.9 Reagenzien für die Lumineszenzmessung .....	10
2.1.10 Gase .....	10
2.2 Zellmaterial .....	11
2.3 Kulturbedingungen .....	11
2.3.1 Kallusherstellung aus sterilem Pflanzenmaterial .....	11
2.3.2 Kalluskultivierung auf MSHe <sub>(S)</sub> .....	12

2.3.3	Induktion von Suspensionskulturen aus Kalluskulturen.....	12
2.3.4	Transfer der Suspensionskulturen.....	12
2.3.5	Vitalitätsbestimmung der Pflanzenzellen in Suspensionskulturen .....	13
2.3.6	Stammhaltung von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 <sup>T</sup> .....	13
2.3.7	Dauerkultur .....	14
2.3.8	Vorkulturen für die Interaktionsexperimente.....	14
2.3.9	Isolation des Hefeelicitors (HE) aus Bäckerhefe .....	15
2.4	Bestimmung von Zellzahlen und Zellmassen.....	15
2.4.1	Frischgewichtbestimmung (FG) .....	15
2.4.2	Gesamtzellzahl der Pflanzenzellen (GKZ) .....	16
2.4.3	OD der Pflanzenzellsuspensionen (OD <sub>578</sub> ).....	16
2.4.4	Trockengewichtbestimmung (TG).....	17
2.4.5	Lebendzellzahlbestimmung der Bakterien (CFU) .....	17
2.4.6	Gesamtzellzahlbestimmung der Bakterien (GKZ).....	17
2.4.7	Optische Dichte der Bakteriensuspensionen (OD <sub>578</sub> ) .....	17
2.5	Analytische Methoden.....	18
2.5.1	Acetylenreduktionstest (ARA).....	18
2.5.2	HPLC-Analysen .....	19
2.5.3	Isotopenverdünnungsmethode für <sup>15</sup> N .....	20
2.5.4	<sup>15</sup> N-Bilanzierung.....	21
2.5.5	Gesamtstickstoffbestimmung.....	22
2.5.6	Enzymatische Ammoniumbestimmung.....	23
2.5.7	Proteinbestimmung .....	24
2.5.8	Saccharose-, Glucose-, Fructosebestimmung .....	25
2.6	Pathogenreaktionsquantifizierung .....	25
2.6.1	Alkalisierungstest.....	25
2.6.2	Luminol/Kaliumhexacyanoferratmethode für die Analysen der Lumineszenz .....	26
2.6.3	Messung der Beladungsfähigkeit von Süßkartoffelzellen mit verschiedenen AM-Farbstoffen für eine Quantifizierung des cytosolischen Calciumlevels.....	27

2.6.4	Kulturröhrenversuche .....	28
2.6.5	Schüttelkolbenexperimente mit Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam .....	29
2.7	Modifikationen des Multiplen Chemostaten (MC) und Fermenterläufe.....	30
2.7.1	Multipler Chemostat .....	30
2.7.2	Vorbereitung eines Chemostatenlaufes.....	31
2.7.3	Chemostatenlauf .....	33
2.7.4	Probenahmebedingungen.....	34
<b>3</b>	<b>Geräteentwicklung für die Pflanzenzellkultivierung ..</b>	<b>36</b>
3.1	Bauliche Veränderungen .....	36
3.2	Softwareentwicklung zur Steuerung des MC.....	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1	Medienoptimierung für die Pflanzenzellen .....	48
4.1.1	Hormonkombination.....	48
4.1.2	Makro- und Mikroelemente .....	50
4.2	Analyse der optimalen Parameter für die Kultivierung von Suspensionskulturen der Süßkartoffel.....	51
4.2.1	Inokulationsdichte.....	52
4.2.2	Tag-/Nachtrhythmus .....	53
4.2.3	Osmolarität des Mediums .....	54
4.2.4	pH-Toleranz .....	55
4.2.5	Saccharosekonzentration.....	56
4.3	Interaktionsexperimente im statischen System .....	57
4.3.1	Schüttelkulturen .....	57
4.3.2	Röhrenexperimente.....	62
4.4	Interaktionsexperimente im Multiplen Chemostaten .....	70
4.5	Pathogenantwort.....	75
4.5.1	Alkalisierungstest.....	75
4.5.2	Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Test.....	77

---

<b>5 Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1 Modifikationen des MC für die kontinuierliche Pflanzenzellkultur .....	88
5.2 Medienoptimierung für die Pflanzenzellen .....	89
5.3 Analyse der optimalen Parameter für die Kultivierung von Suspensionskulturen der Süßkartoffel.....	90
5.4 Interaktionsexperimente im statischen System .....	93
5.5 Interaktionsexperimente im Multiplen Chemostaten .....	98
5.6 Pathogenantwort.....	101
5.7 Ausblick .....	107
<b>6 Literatur.....</b>	<b>108</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>115</b>
7.1 Geräte .....	115
7.2 Lebenslauf .....	116

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Konstruktionsschema des MC .....	39
Abb. 3.2	Programmablaufplan des MC .....	42
Abb. 3.3	Auswahlmenü des MC.....	44
Abb. 3.4	Bildschirmausgabe während eines Chemostatenlaufes.....	46
Abb. 4.1	Einfluß der Hormonkombination im MSHe <sub>(S)</sub> auf das Wachstum der Kalluszellen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	49
Abb. 4.2	Einfluß der Mikroelementekomposition im Festmedium auf das Wachstum des Kallus von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.....	51
Abb. 4.3	Einfluß der Inokulationsdichte auf das Wachstum der Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> .....	52
Abb. 4.4	Einfluß des Tag-/Nachtrhythmuses auf das Wachstum der Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> .....	53
Abb. 4.5	Einfluß der Osmolarität des MSHe <sub>(L)</sub> auf das Wachstum der Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur.....	54
Abb. 4.6	Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> .....	55
Abb. 4.7	Einfluß der Saccharosekonzentration im MSHe <sub>(L)</sub> auf das Wachstum der Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur.....	56
Abb. 4.8	Vergleich des Wachstums von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> mit der limitierenden Kohlenstoffkonzentration .....	58
Abb. 4.9	Vergleich des Wachstums von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> mit limitierender Kohlenstoffkonzentration.....	59
Abb. 4.10	Vergleich der Zuckerverwertung in den Reinkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam und von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 mit der Mischkultur in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> .....	60

Abb. 4.11	IAA-Konzentrationen in den Reinkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam und von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 und in der Mischkultur in Schüttelkultur auf MSHe <sub>(L)</sub> .....	61
Abb. 4.12	Vergleich des Kalluswachstums von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne Saccharose .....	62
Abb. 4.13	Vergleich des Zellwachstums von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne Saccharose anhand der OD <sub>578</sub> .....	63
Abb. 4.14	Vergleich des Zellwachstums von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne Saccharose anhand der CFU.....	64
Abb. 4.15	Vergleich des Kalluswachstums von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne gebundenen Stickstoff.....	65
Abb. 4.16	Vergleich des Zellwachstums von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne gebundenen Stickstoff anhand der OD <sub>578</sub> .....	66
Abb. 4.17	Vergleich des Zellwachstums von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 als Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne Stickstoff anhand der CFU.....	67
Abb. 4.18	Ethenproduktion in den Reinkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam und <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 und in der Mischkultur in Kulturröhren auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne Saccharose.....	68
Abb. 4.19	Inkorporation von molekularem Luftstickstoff während des Kalluswachstums von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 auf MSHe <sub>(L)</sub> ohne gebundenen Stickstoff in Kulturröhren.....	69
Abb. 4.20	Wachstumsraten der Zellen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam bei vier verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten in kontinuierlicher Kultur im MC.....	71

Abb. 4.21	Wachstumsraten von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 bei drei verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten in kontinuierlicher Kultur im MC.....	72
Abb. 4.22	Maximale Wachstumsrate <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in MSHe <sub>(L)</sub> mit 5 g/l Saccharose im MC (D: 0,103).....	73
Abb. 4.23	Generationszeiten von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in MSHe <sub>(L)</sub> bei verschiedenen Durchflußraten. ....	73
Abb. 4.24	Generationszeiten von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam in Reinkultur und in Mischkultur mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in MSHe <sub>(L)</sub> bei verschiedenen Durchflußraten. ....	74
Abb. 4.25	Minimale Generationszeiten der Zellen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam und <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 in Reinkultur und in gemeinsamer Mischkultur in MSHe <sub>(L)</sub> mit im MC (D: 0,103). ....	75
Abb. 4.26	Einfluß des HE auf die Alkalisierung des Außenmediums in Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.....	76
Abb. 4.27	Verlauf einer Einzelmessung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -abhängigen Photonenemmission als Resultat einer Phytopathogenantwort in Suspensionskulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE. ....	77
Abb. 4.28	Untersuchung der Eignung des HE zur Induktion einer Phytopathogenantwort in Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	78
Abb. 4.29	Einfluß der HE-Konzentration auf die Intensität der Phytopathogenantwort der Pflanzenzellkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. unter Verwendung der Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Methode. ....	79
Abb. 4.30	Einfluß der HE-Konzentration auf die Intensität der Phytopathogenantwort der Pflanzenzellkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. unter Verwendung des QuantaBlue Testes.....	80
Abb. 4.31	Einfluß des Tag-/Nachtrhythmuses auf die Responsivität der Pflanzenzellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE. ....	81
Abb. 4.32	Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit auf die Responsivität der Pflanzenzellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE. ....	82

Abb. 4.33	Einfluß der Zelldichte auf die Responsivität der Pflanzenzellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE. ....	83
Abb. 4.34	Einfluß des Etablierungsgrades einer Pflanzenzellsuspension auf die Intensität der Phytopathogenantwort von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE.....	84
Abb. 4.35	Untersuchung der optimalen Kulturdauer nach der letzten Passage auf frisches Medium für die Intensität der Phytopathogenantwort der Pflanzenzellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam nach Elicitation durch HE.....	85
Abb. 4.36	Einfluß von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 auf die durch HE vorinduzierte Phytopathogenantwort in Pflanzenzellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	86
Abb. 4.37	Einfluß von <i>Herbaspirillum seropedicae</i> M4 auf die durch HE vorinduzierte Phytopathogenantwort in Zellsuspensionen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	87
Abb. 5.1	Modifiziertes symbiontisches Elicitor-Suppressor Modell.....	104
Abb. 5.2	Änderung der relativen Fluoreszenz zur Überprüfung des Beladungszustandes mit $\text{Ca}^{2+}$ von suspendierten Zellen von <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam. ....	106

## Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1	Zuordnung zwischen Kippschalter und auszuführender Prozedur .....	41
Tab. 4.1	Kontrolle des Kalluswachstums auf MSHe <sub>(S)</sub> mit verschiedenen Hormonkombinationen. ....	49

## II Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ARA	Acetylenreduktionstest (acetylene reduction assay)
ATCC	American Type Culture Collection
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BAP	Benzylaminopurin
BNF	Biologische Stickstofffixierung (biological nitrogen fixation)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CFU	Lebendzellzahl der Bakterien (colony forming units)
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
d	Tage (days)
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBRAPA-CNPAB	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia
ENEA-Cassacia	Comitato Nazionale per la ricerca e per lo sviluppo dell' Energia Nucleare e delle Energie Alternative
FG	Frischgewicht
h	Stunden (hours)
HE	Hefeelicitor
He	Heller
g	Gramm
IAA	Indole-3-acetic acid
Ib	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam
IBA	Indole-3-butyric acid
LGI-P	Selektivmedium für <i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i> Pal5
LKZ	Lebendkeimzahl
min	Minuten (minutes)
MC	Multipler Chemostat

---

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mod.	modifiziert
mosmol	Milliosmolar
MS	Murashige and Skoog
MPN	Wahrscheinlichste Keimzahl (most probable number)
n	Elemente einer Grundgesamtheit (Anzahl der Parallelen)
nm	Nanometer
NA	Nähragar
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte bei $\lambda = 578$ nm im Photometer
Pal5 <sup>T</sup>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 <sup>T</sup> (Type strain)
PBS	isotonischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden (seconds)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
U/min	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
$\sigma$	Standardabweichung einer Grundgesamtheit mit n Elementen
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter

## 1 Einleitung

In Pflanzen kommen verschiedenartig zusammengesetzte Populationen von Bakterien, Endophyten, vor. Diese können je nach Art das Wachstum der Pflanzen negativ (pathogene Bakterien) oder positiv beeinflussen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß diazotrophe Endophyten sehr effektive Stickstofffixierer sein können und ganz wesentlich zur Stickstoffversorgung ihrer Wirtspflanze beitragen. Dies ist ganz besonders bei *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* und *Herbaspirillum seropedicae* festgestellt worden. 120-150 kg/ha Stickstoffeintrag aus der Atmosphäre konnten in deren Wirtspflanzen bilanziert werden.

Es wurde nachgewiesen, daß *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Zuckerrohr zu erheblicher Stickstoffersparnis führt und ähnliche Ergebnisse wurden auch nach dem Einschleusen des Endophyten für die Süßkartoffel *Ipomoea batatas* gefunden. Mit einer Mischinokulation von *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia cepacia* und *Azospirillum brasilense* wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Diese konkret zu messenden Werte werden ergänzt durch schwer zu fassende positive Auswirkungen allgemeiner Art auf die Pflanze. Hier gibt es z.B. morphologische Veränderungen, wie die verbesserte Wurzelhaarbildung und die Zunahme der Pflanzengröße durch Abgabe von pflanzenwirksamen Hormonen durch die endophytischen Bakterien. Die experimentelle Erfassung dieser Phänomene wird durch die Komplexität des Systems Pflanze/Mikroorganismus/Boden stark erschwert.

Um die Abläufe in der Pflanze und deren Interaktionen mit den Endophyten zu untersuchen, müssen die Beziehungen auf zellulärer Ebene unter definierten Bedingungen geklärt werden. Für die Simulation der Situation in der Pflanze kann ein Modellsystem, der Multiple Chemostat (MC) eingesetzt werden, in dem bereits die Interaktionen zwischen diazotrophen Endophyten untersucht wurden.

Für die Interaktionen zwischen Pflanzenzellen und Bakterien sind auch die Erkennungsmechanismen für die erfolgreiche Kolonisation durch den Endophyten von Bedeutung. Diese Erkennung, über die derzeit noch wenig bekannt ist, entscheidet, ob die Pflanze den Mikroorganismus toleriert oder eine Pathogenantwort gegen diesen einleitet. Die zellulären Interaktionen wurden mit pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) und dem diazotrophen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 im MC untersucht.

## **1.1 Ipomoea batatas (L.) Lam**

### **1.1.1 Die Spezies**

Die Süßkartoffel gehört zu den wichtigsten Kulturpflanzen der Welt und wird bevorzugt in tropischen Regionen kultiviert. Die Hauptanbauggebiete liegen in Asien, Afrika und Südamerika, wo die Süßkartoffel das Hauptnahrungsmittel, speziell der ärmeren Bevölkerungsschichten ist (Peirce 1987). Zusätzlich kann die Süßkartoffel als alternative Energiequelle verwendet werden, indem sie als Rohmaterial für die Methan- oder Ethanolherstellung (Locascio and Dangler 1986) eingesetzt wird.

Neben diesem großen wirtschaftlichen Nutzen der Anbaupflanze sind die Verfügbarkeit endophytenfreier Pflanzen und daß die Süßkartoffel einen natürlichen Wirt von *Gluconacetobacter diazotrophicus*, einer der effektivsten diazotrophen Endophyten darstellt, die wesentlichen Gründe für den Einsatz dieser Kulturpflanze für diese Arbeit.

### **1.1.2 Zellkulturen**

Zellkulturen sind heutzutage speziell im Zierpflanzenbau weit verbreitet, weil sie für die erregerefreie Pflanzenvermehrung besonders geeignet sind. In der Forschung werden bevorzugt pflanzliche Zellkulturen aus meristematischen Geweben entwickelt. Die daraus resultierenden, undifferenzierten Kalluszellen,

besitzen die genetische Information der gesamten Pflanze, wodurch in Experimenten mit diesen Kulturen Reaktionen jedes Pflanzengewebes simuliert werden können. Ein weiterer Vorteil der meristematischen Zellkulturen liegt darin, daß die Zellen eine einheitliche genetische Information besitzen und dadurch homogen auf äußere Reize reagieren. Diese Homogenität potenziert in der Zellkultur die Effekte, die in der Gesamtpflanze auf Einzelzellen oder Zellgewebe beschränkt bleiben würden und macht dadurch Reaktionen der Pflanzenzellen auf äußere Einflüsse quantifizierbar. Die Kalluskulturen wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die zellulären Reaktionen der Pflanze während der Interaktion mit einem endophytischen Bakterium und bezüglich der Phytopathogenantwort zu untersuchen.

## 1.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5

*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Gillis et al., 1989) ist ein stickstofffixierendes, endophytisches Bakterium, das aus Zuckerrohr (*Saccharum* sp.), der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*), Hirsegras (*Pennisetum purpureum*) und vor kurzem auch aus der Kaffeepflanze *Coffea arabica* isoliert worden ist. Das Bakterium, das als obligater Endophyt in seinen Wirtspflanzen lebt, versorgt diese mit fixiertem Luftstickstoff. Für *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 konnten Eintragsraten von bis zu 150 kg N pro Hektar und Jahr (Urquiaga et al., 1989; Boddey et al., 1991; Urquiaga et al., 1992) nachgewiesen werden, was der Größenordnung von Rhizobien entspricht und es gehört damit zu den leistungsfähigsten diazotrophen Bakterien. Der Endophyt fixiert molekularen Stickstoff über den Eigenbedarf hinaus und gibt ihn aktiv an seine Wirtspflanze ab (bis zu 50 %), was bisher für keinen anderen Stickstofffixierer nachgewiesen werden konnte. Ebenso einmalig für diazotrophe Bakterien ist, daß *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Gegenwart von Nitrat weiter Stickstoff fixiert, denn es verfügt über keine Nitratreduktase und kann dadurch diese Form des gebundenen Stickstoffs nicht verwerten (Teixera et al., 1987). Dies eröffnet die Möglichkeit, daß der Endophyt supplementierend zur Stickstoffversorgung seiner Wirtspflanze beitragen kann (Cojho et al., 1993), da

Nitrat als Stickstoffdünger in der Landwirtschaft eingesetzt wird. Inzwischen ist es gelungen das Wirtsspektrum von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf Hirse (DelGallo et al., 1992; Paula et al., 1991) und Mais (Caballero-Mellado et al., 1997) zu erweitern. Bei Hirse konnte nach der Kolonisation ein eindeutiger Stickstoffeintrag nachgewiesen werden (Paula et al., 1991;1992).

Neben dem Stickstoffeintrag in die Pflanze werden weitere Stimulationen des Pflanzenwachstums durch die Endophyten diskutiert. In Bezug auf *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 scheint die nachgewiesene Produktion des Phytohormons Indoleessigsäure (IAA) durch das Bakterium eine Wachstumsförderung seiner Wirtspflanze wahrscheinlich zu machen. IAA ist ein Auxin, das die Zellstreckung der Pflanzenzellen induziert und fördert, sowie die Zellteilung und die Wurzelbildung positiv beeinflusst (Costacurta and Vanderleyden, 1995).

### 1.3 Chemostat

Der Chemostat ist ein Labormodell in dem die Situation in der Pflanze simuliert wird. Entsprechend der natürlichen Bedingungen in einer Pflanze, die an einen festen Standort gebunden ist, können die Kulturbedingungen in einem Chemostaten konstant gehalten werden. Vor allem die permanente Zuführung von frischen Nährstoffen und die Entsorgung sekundärer Metabolite, die in den Geweben der Pflanzen kontinuierlich stattfinden, werden auch im Modell gewährleistet. Die Durchlüftung der Gewebe, die in einem gleichbleibenden Sauerstoffpartialdruck resultiert und der konstante pH-Wert in diesen Bereichen können im Chemostaten imitiert werden.

Der Chemostat bietet darüber hinaus die Möglichkeit, durch die Änderung einzelner Parameter, deren Einfluß auf das Zellwachstum im Kulturgefäß zu protokollieren. Dies bedeutet eine schnelle und vor allem kostengünstige Alternative zu Gewächshaus- oder Freilandexperimenten. Durch die neue, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Generation der Chemostaten wird es möglich

werden, nicht nur das Wachstum von Bakterien unter definierten kontinuierlichen Bedingungen zu analysieren, sondern auch das von suspendierten Pflanzenzellen.

## 1.4 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll ein Chemostatensystem, der Multiple Chemostat (MC), für die kontinuierliche Kultivierung von Pflanzenzellsuspensionen im Labormodell weiterentwickelt werden. In diesem System sollen die Interaktionen zwischen der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) und dem diazotrophen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 untersucht werden. Die positiven Effekte, die das Bakterium nachweislich auf die gesamte Wirtspflanze ausübt, sollen auf zellulärer Ebene untersucht werden. Zusätzlich wird die Rolle der IAA bei den Interaktionen zwischen Wirtspflanzenzellen und Endophyten analysiert. Abschließend wird der Einfluß des Endophyten auf eine, durch Hefeelicitor (HE) vorinduzierte Phytopathogenantwort der Süßkartoffelzellen untersucht.

## 2 Medien und Methoden

### 2.1 Medien und Chemikalien

#### 2.1.1 Medium (MSHe) nach Murashige and Skoog und Heller

Flüssigmedium für Suspensionskulturen von *Ipomoea batatas* (MSHe<sub>(L)</sub>)

Kohlenstoffkomponenten:	Casein	1000 mg/l
	m-Inosit	100 mg/l
	Malat	100 mg/l
	Saccharose	20000 mg/l
Makroelemente MS:	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	439,68 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00 mg/l
	KNO <sub>3</sub>	1900,00 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	369,54 mg/l
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00 mg/l
Mikroelemente He:	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,054 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03 mg/l
	FeEDTA-Na	36,70 mg/l
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,80 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20 mg/l
	KJ	0,01 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,08 mg/l
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,03 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00 mg/l
	Vitamine:	Nicotinsäure
Pyridoxin-Hydrochlorid		1,00 mg/l
Thiamin-Hydrochlorid		1,00 mg/l
Hormone:	Benzylaminopurin (BAP)	1,00 mg/l
	Naphthalene Acetic Acid (NAA)	1,00 mg/l
	pH-Wert	5,8

Festmedium für Kalluskulturen von *Ipomoea batatas* (MSHe<sub>(S)</sub>)

MSHe <sub>(L)</sub>	wie oben
Agar (DIFCO 0138-01-4)	7000 mg/l

Semisolidmedium für die Stammhaltung von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup> (MSHe<sub>(SS)</sub>)

MSHe <sub>(L)</sub>	wie oben
Agar (DIFCO 0138-01-4)	2500 mg/l

### 2.1.2 LGI-P-Medium

Selektivmedium für *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup>

Kohlenstoffkomponente:	Rohrzucker	100000 mg/l
Makro-/Mikroelemente:	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg/l
	NaCl	100 mg/l
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg/l
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mg/l
	Bromthymolblau (0,5% in 0,2N KOH)	2,5 ml/l
Puffer:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600 mg/l
	H <sub>2</sub> O	ad 1,0 l
	pH-Wert	6,0

Festmedium	Medienbestandteile	wie oben
	Hefeextrakt	20 mg/l
	Agar (DIFCO 0138-01-4)	16000 mg/l

Semisolidmedium	Medienbestandteile	wie oben
	Hefeextrakt	20 mg/l
	Agar (DIFCO 0138-01-4)	2500 mg/l

Bei der Herstellung der LGI-P-Medien wurden die Phosphate und der Rohrzucker jeweils separat autoklaviert und erst nach dem Abkühlen steril mit den Makro-/Mikroelementen vereint. Dadurch wurde die Bildung schwer löslicher Phosphatsalze und die Karamelisation des Zuckers während des Autoklavierens verhindert.

### 2.1.3 Vorinkubationsmedium für die Lumineszenzmessungen (Vim)

Kohlenstoffkomponenten:	Saccharose	3000 mg/l
Makroelemente:	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	17,59 mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,80 mg/l
	KNO <sub>3</sub>	76,00 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,78 mg/l
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	66,00 mg/l
Mikroelemente:	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,001 mg/l
	FeEDTA-Na	1,468 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,248 mg/l
	KJ	0,033 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,676 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,010 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,344 mg/l
	pH-Wert	5,8

Die Medienzusammensetzung für das Vorinkubationsmedium entspricht 40 ml Murashige und Skoog Kompletmedium (Duchefa Nr. M0221), das mit Aqua bidest. auf 1 l Endvolumen aufgefüllt wird.

**2.1.4 Phosphat-gepufferte-Saline (PBS)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	430 mg/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1680 mg/l
$\text{NaCl}$	7200 mg/l
pH-Wert	6,8

**2.1.5 Nutrient Agar (Merck 5450) NA**

NA-Pulver	20000 mg/l
-----------	------------

**2.1.6 Reagenzien für die Vitalitätsbestimmung der Pflanzenzellen**

Fluorescein-Diazetat (in Aceton)	4 mg/ml
Phosphatpuffer	5 mM
pH-Wert	7,2
Ethidiumbromid (in Phosphatpuffer)	1 mg/ml

**2.1.7 Reagenzien für die Herstellung des Hefeelicitors**

Citratpuffer	100 mM
pH-Wert	7,5
Ethanol	96 %

### 2.1.8 Proteinbestimmung

Trichloressigsäure		26	%
Natriumhydroxid		3	%
Benedict´s Reagenz	Natriumcitrat	173	g
	Natriumcarbonat	100	g
	in 500 ml Aqua bidest. unter schwachem Erhitzen lösen, dann filtrieren		
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	17,3	g
	in 100 ml Aqua bidest. unter schwachem Erhitzen lösen, dann zum Filtrat geben und ad 1 l mit Aqua bidest..		
	Lagerung der Lösung erfolgt im Dunklen.		

### 2.1.9 Reagenzien für die Lumineszenzmessung

Luminol		10,7	mg
Kaliumhexacyanoferrat		4600	mg/l
Kaliumphosphatpuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	50	mM
	pH-Wert	7,9	

### 2.1.10 Gase

Die während der Fermentation verwendeten Gase synthetische Luft (80% N<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub>) und Stickstoff entsprachen der Reinheitsstufe 5.0.

Für den Acetylenreduktionstest (ARA) wurde Ethin (technisches Gas) und Ethen der Reinheitsstufe 2.8 der Firma *Air Products*, Hattingen verwendet.

## 2.2 Zellmaterial

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam		Zur Verfügung gestellt vom ENEA Casaccia, Rom
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Pal5 <sup>T</sup>	DSM 5601; Type strain ATCC 49037
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	M4	Isolat aus <i>Saccharum</i> spec. Zur Verfügung gestellt vom Embrapa/CNPS, Rio de Janeiro

## 2.3 Kulturbedingungen

### 2.3.1 Kallusherstellung aus sterilem Pflanzenmaterial

Eine unter sterilen Bedingungen kultivierte, endophytenfreie Süßkartoffelpflanze, die ca. 4 Wochen alt war, wurde für die Initiierung des Kalluswachstums verwendet. Mit einem Skalpell wurde das Sproßmeristem herauspräpariert und auf MSHe<sub>(S)</sub> ausgelegt. Diese Meristemstücke wurden bei 28° C, 79% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtintensität von 30000 Lux in der Klimakammer inkubiert. Nach 7-12 Tagen zeigten die Meristemstücke ein deutliches Zellwachstum an den Schnittflächen. Diese Zellhaufen wurden mikroskopisch auf ihren Differenzierungsgrad untersucht. Undifferenzierte Zellansammlungen wurden auf frisches MSHe<sub>(S)</sub> transferiert und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen inkubiert. Während der folgenden 4 Wochen wurden die Zellen regelmäßig auf Differenzierung untersucht und nur undifferenzierte Zellhaufen (Kallus) für die zweite Passage auf frisches Medium verwendet. Durch stetige mikroskopische Kontrolle der Zellkulturen wurde deren Kalluscharakter überprüft und gewährleistet.

### **2.3.2 Kalluskultivierung auf MSHe<sub>(S)</sub>**

Die Kalli wurden jeweils nach 21 Tagen auf frisches Medium transferiert. Dazu wurden die Zellhaufen mit einem sterilen Löffel von dem Restmedium getrennt und in einer Petrischale gesammelt. Hier wurde der Kallus mit dem Löffel zerdrückt, damit keine großen Zellverbände auf das frische Medium überführt wurden. Der auf diese Weise homogenisierte Kallus wurde dann als dünner Rasen auf dem frischen MSHe<sub>(S)</sub> ausgestrichen und bei einer Tagphase von 16 h mit 28° C und 30000 Lux und einer Dunkelphase von 8 h mit 20° C, sowie konstanten 79 % Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer kultiviert.

### **2.3.3 Induktion von Suspensionskulturen aus Kalluskulturen**

Der Kallus einer Platte wurde 10-15 Tage nach der letzten Passage, wie zuvor beschrieben, mit einem sterilen Löffel vom Medium gesäubert und in einer Petrischale homogenisiert. 4 g dieses Zellmaterials wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, in dem 40 ml MSHe<sub>(L)</sub> vorgelegt waren. Diese 10 %ige Zellsuspension wurde bei 180 U/min auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Kulturbedingungen entsprachen den Verhältnissen für die Kalluskulturen auf dem Festmedium (16 h Tagphase, 28° C, 30000 Lux, 8 h Dunkelphase, 20° C, 79 % Luftfeuchtigkeit).

### **2.3.4 Transfer der Suspensionskulturen**

Die Suspensionskulturen, die aus Kalluskulturen induziert worden waren, wurden in der 4. Kulturwoche komplett in sterile 500 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 40 ml frischem MSHe<sub>(L)</sub> auf das doppelte Medienvolumen aufgefüllt. Danach wurde die Suspension unter den oben definierten Bedingungen für weitere 3-4 Wochen kultiviert und nach dieser Zeit erneut mit frischem Medium (80 ml) aufgefüllt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal nach gleicher Kulturdauer mit 160 ml Medium durchgeführt, so daß ein Endvolumen von 320 ml Zellsuspension erzeugt wurde.

1. Passage: Die Zellsuspension (320 ml) wurde vom Schüttler genommen und ruhen gelassen, bis sich größere Zellaggregate am Boden abgesetzt hatten (nach ca. 2 min). Dann wurden jeweils 100 ml des Überstandes mit den darin befindlichen Einzelzellen und kleinen Zellaggregaten in die gleiche Menge frisches Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die weiteren Passagen erfolgten immer in der 4. Kulturwoche auf die zuvor beschriebene Weise.

### 2.3.5 Vitalitätsbestimmung der Pflanzenzellen in Suspensionskulturen

Die Vitalität der Pflanzenzellen wird im Fluoreszenzmikroskop nach Zugabe zweier Fluoreszenzfarbstoffe, Fluoreszein-Diazetat (FDA/Serva Nr. F7378) und Ethidiumbromid (EtBr) bestimmt. FDA wird nur von lebenden Zellen aufgenommen, die dieses nichtfluoreszierende Reagenz hydrolytisch spalten und in die fluoreszierende Verbindung Fluoreszein umwandeln. Das Cytoplasma vitaler Zellen leuchtet im Fluoreszenzmikroskop grün. Abgestorbene Zellen werden durch EtBr angefärbt, das nicht in lebende Zellen eindringen kann. Der Kern abgestorbener Zellen fluoresziert nach der Anfärbung mit EtBr rot.

Für die Färbung wurden Stammlösungen mit 4 mg/ml FDA in Aceton und 1 mg/ml EtBr in Phosphatpuffer pH 7,2 hergestellt. Von diesen Stammlösungen wurden jeweils 0,5 ml in 4 ml Phosphatpuffer (5mM) gegeben und mit 95 ml Zellsuspension, die zuvor auf frisches MSHe<sub>(S)</sub> passagiert wurde, gemischt. Dann wurde die Fuchs-Rosenthal Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop befüllt und die vitalen grünen und die abgestorbenen roten Pflanzenzellen ausgezählt.

### 2.3.6 Stammhaltung von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup>

Der Bakterienstamm wurde auf MSHe<sub>(S)</sub>- und MSHe<sub>(SS)</sub>-Medium kultiviert.

Die Kulturen auf dem festen Medium wurden alle 14 Tage, die im Semisolidmedium alle 21 Tage auf frisches Medium überimpft. Bei jedem Transfer wurden die Kulturen mikroskopisch auf Kontaminationen überprüft und

die Einheitlichkeit der Koloniemorphologie auf den Platten verglichen. Von den Semisolidkulturen wurden dafür Proben auf festem Medium ausgestrichen.

### 2.3.7 Dauerkultur

(Reinhold 1989)

Um mögliche genetische Veränderungen der Bakterien auszuschließen, wurden Dauerkulturen angelegt, die bei  $-84^{\circ}\text{C}$  in der Gefriertruhe aufbewahrt wurden. Für die Herstellung dieser Dauerkulturen wurde eine Bakteriensuspension verwendet, in der sich die Bakterien im exponentiellen Wachstum befanden. Diese Kultur wurde steril zentrifugiert und das Pellet in wenig PBS resuspendiert ( $\text{OD}_{578}$ : höher als 2.0). 1 ml dieser Suspension wurde mit der gleichen Menge steriler Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösung, die als Frostschutzmittel diente, gemischt und sofort bei  $-84^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Alle Arbeitsschritte wurden mit zuvor gekühlten Materialien und Medien bei einer Temperatur von  $0^{\circ}\text{C}$ - $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, wodurch die Zellen vor einer Schädigung durch das Frostschutzmittel bewahrt wurden.

Zur Reaktivierung der Bakterien wurden ca. 10  $\mu\text{g}$  der gefrorenen Suspension mit der Impföse abgenommen und in 100 ml flüssiges Selektivmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die toxische Wirkung des DMSO wurde durch die starke Verdünnung mit dem Medium aufgehoben.

Durch diese Dauerkulturen wurde das Bakterienmaterial der Stammhaltung jeweils nach dem 5. Transfer der Semisolidkulturen (nach 15 Wochen) ersetzt. Dadurch wurde möglichen Mutationen der Bakterien während der langen Kultivierung in der Stammhaltung vorgebeugt.

### 2.3.8 Vorkulturen für die Interaktionsexperimente

*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup> wurde in 100 ml MSHe<sub>(L)</sub> in einem 250 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und bei  $30^{\circ}\text{C}$  und 120 U/min für 30 h inkubiert.

### **2.3.9 Isolation des Hefeelicitors (HE) aus Bäckerhefe**

(Baier 1996)

Es wurde 1 kg Hefe in 1,5 l Citratpuffer suspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur und 200 U/min gerührt. Danach wurde die Suspension 46 min bei 121° C autoklaviert und anschließend 30 min bei 7000 U/min im JA10-Rotor (ca. 8000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und über einen Faltenfilter gegeben. Das Filtrat wurde erneut zentrifugiert (10 min; 7000 U/min; JA10-Rotor) und der Überstand wieder dekantiert. Das Pellet (Nr. 1) wurde für die weitere Behandlung im Kühlraum (4° C) gelagert, der Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Ethanol gemischt. Dieses Gemisch wurde für 24 h bei 4° C gerührt. Dann wurde es für 10 min bei 7000 U/min im JA10-Rotor zentrifugiert, der Überstand diesmal verworfen und das Pellet (Nr. 2) weiter verwendet. Die beiden Pellets (Nr. 1 und Nr. 2) wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst und 60 min unter den zuvor beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dann lyophilisiert. Die Trockenmasse wurde als Hefeelicitor in den Versuchen eingesetzt.

## **2.4 Bestimmung von Zellzahlen und Zellmassen**

### **2.4.1 Frischgewichtbestimmung (FG)**

Die Feuchtwichtbestimmungen wurden versuchsabhängig mit unterschiedlichen Probevolumina durchgeführt. In den Experimenten mit festem Kallus (4.3.2) wurde das Gewicht des gesamten Zellmaterials bestimmt, nachdem der Kallus von allen Medienresten gesäubert worden war. Dies erfolgte mit Pinzetten und Spateln unter dem Binokular.

In den Untersuchungen mit Suspensionskulturen in statischer Kultur im Erlenmeyerkolben (4.3.1) wurde das Probevolumen von 5 ml und in den kontinuierlichen Kulturen in den Chemostatenexperimenten (4.4) von 10 ml gewählt. Die Behandlung der Proben war in diesen Experimenten gleich.

Ein Rundfilterpapier wurde in eine Nutsche gelegt und 10 ml  $\text{MSHe}_{(L)}$  für 10 min an der Wasserstrahlpumpe bei maximaler Leistung abgesaugt. Der feuchte Filter wurde auf der Analysenwaage gewogen und in die Nutsche zurückgelegt. Die Probe wurde auf diesen Filter gegeben und ebenfalls für 10 min bei gleicher Leistung abgenutscht und gewogen. Längeres nutschen änderte das Feuchtgewicht nicht mehr.

#### **2.4.2 Gesamtzellzahl der Pflanzenzellen (GKZ)**

Es wurde 1 ml Zellsuspension in ein Reagenzglas pipettiert und mit 1 ml Chromsäure ( $4,5 \text{ g CrO}_3 + 25,5 \text{ ml H}_2\text{O}$ ) versetzt. Die Reagenzgläser wurden mit Schraubdeckeln verschlossen und danach für 20 min bei  $60^\circ \text{ C}$  im Wasserbad erhitzt. Zu Beginn und am Ende der Erwärmung wurden die Proben mit Pasteurpipetten mehrmals aufgezogen, wodurch der Zerfall der Aggregate beschleunigt wurde. Die Suspension wurde anschließend mit 4 ml NaCl-Lösung (0,5 % w/v) verdünnt und in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer ausgezählt.

#### **2.4.3 OD der Pflanzensuspensionen ( $\text{OD}_{578}$ )**

Die Probenahme aus den Pflanzensuspensionen wurde mit abgesägten Glaspipetten durchgeführt. Diese Pipetten hatten eine erweiterte Öffnung, durch die auch größere Zellaggregate problemlos angesaugt werden konnten.

Für die Bestimmung der OD in Schüttelkulturen wurden Probenvolumina von 2 ml, aus den kontinuierlichen Kulturen im Chemostaten 10 ml entnommen. Die Proben wurden dann in einen 10 ml Handpotter überführt und bis zur optischen Konstanz (konstanter Wert bei der Extinktionsmessung) gepottert. Dies dauerte, in Abhängigkeit vom Zellmaterial, 3-5 min. Die OD wurde im Einstrahlphotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm ( $\text{OD}_{578}$ ) gemessen. Keine oder geringe Schwankungen ( $\pm 0,01$ ) belegten die optische Konstanz der Probe, bei größeren Schwankungen wurde erneut gepottert, bis diese im Toleranzbereich lagen.

#### **2.4.4 Trockengewichtbestimmung (TG)**

Die Proben der Feuchtgewichtbestimmung wurden bei 55° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Diese stellte sich nach 4-6 Tagen ein. Die Wägung erfolgte an der Analysenwaage. Die Proben wurden danach im Exsikkator aufbewahrt und eine Woche später erneut gewogen. Dieses Gewicht wurde als Trockengewicht verwendet.

#### **2.4.5 Lebendzellzahlbestimmung der Bakterien (CFU)**

Die Lebendzellzahlbestimmung (colony forming units) diente zur Bestimmung und Überprüfung der Bakterientiter in den Vorkulturen und im multiplen Chemostaten. Zusätzlich wurden die Kulturen auf diese Art und Weise auf Kontaminationen untersucht. Dazu wurden Verdünnungsreihen (bis  $10^{-8}$ ) mit PBS hergestellt und die Verdünnungsstufen von  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  auf MSHe<sub>(S)</sub> mit Hilfe steriler Glaspipetten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30° C im Brutschrank.

#### **2.4.6 Gesamtzellzahlbestimmung der Bakterien (GKZ)**

Ein Aliquot der Suspensionen wurde mit 0,6 %iger Formalinlösung versetzt, um die Bakterien zu immobilisieren und dadurch die Zählung in der Thomakammer zu ermöglichen. Wenn nötig, wurde die Bakteriensuspension mit PBS auf eine Zellzahl zwischen 50-100 Zellen pro Großquadrat verdünnt. Es wurden jeweils 4 Großquadrate diagonal ausgezählt, und daraus der Mittelwert gebildet.

#### **2.4.7 Optische Dichte der Bakteriensuspensionen (OD<sub>578</sub>)**

Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt und diente zur Bestimmung des Volumens, das aus der Vorkultur als Inokulat für die Chemostaten entnommen werden mußte. Außerdem wurde sie bei jeder Probenahme zur Bestimmung der Bakteriensuspension im Chemostaten verwendet.

## 2.5 Analytische Methoden

### 2.5.1 Acetylenreduktionstest (ARA)

(Hardy et al. 1973)

Theorie: Der Acetylenreduktionstest ist eine indirekte Methode den diazotrophen Charakter von Bakterien nachzuweisen und eine Quantifizierung der Enzymaktivität des verantwortlichen Enzymkomplexes Nitrogenase vorzunehmen. Diese Nachweismethode beruht auf der Tatsache, daß die Nitrogenase nicht nur molekularen Stickstoff zu Ammonium reduziert, sondern relativ unspezifisch Moleküle mit Dreifachbindungen umsetzt. Zu diesen Molekülen gehört das Ethin (Acetylen), das durch den Nitrogenasekomplex zu Ethen (Ethylen) reduziert wird. Das produzierte Ethen wird gaschromatografisch detektiert und über ein ins Gerät integriertes Interface als Ausschlag (Peak) auf einem Schreiber ausgegeben. Die Peakhöhe entspricht dem Gehalt an Ethen in der Probe und die Quantifizierung erfolgt durch die Kalkulation unter Berücksichtigung eines Eichstandards, der aus einem Gemisch von 1 % Ethen und 1 % Ethin besteht. Die relative Nitrogenaseaktivität wird in nmol gebildetes Ethen gemessen und betrachtet nur die absoluten Werte.

$$C_2H_4 [nmol/h] = \frac{Peakhöhe_p [cm] \cdot AS \cdot V_G [ml]}{V_p [ml] \cdot \text{relativerEichpeak} [cm/\mu l] \cdot \frac{V_{C_2H_4} [\mu l]}{N_{C_2H_4} [nmol]} \cdot Inkubationszeit [h]}$$

Peakhöhe <sub>p</sub>	Peakhöhe der Probe
AS	Einstellung der Signalabschwächung am GC
V <sub>G</sub>	Gasraum des Probengefäßes [ml]
V <sub>P</sub>	injiziertes Probevolumen [ml]
Relativer Eichpeak	Peakhöhe des Eichstandards · AS · 1 μl <sup>-1</sup> [cm · μl <sup>-1</sup> ]
$\frac{V_{C_2H_4} [\mu l]}{N_{C_2H_4} [nmol]}$	Molaritätsberechnung des Gasvolumens (0,0224 μl/nmol)
Inkubationszeit	Inkubationszeit der Probe mit Ethin [h]

### 2.5.2 HPLC-Analysen

Theorie: Die High Performance Liquid Chromatography ist ein Verfahren zur Trennung und Detektion von Substanzen, die in einer Flüssigkeit gelöst sind. Die Probe wird mittels eines Eluenten unter hohem Druck (220 bar) durch eine stationäre Phase gepumpt, an der die Substanzen für eine charakteristische Zeitdauer adsorbieren. Die Adsorptionszeit der einzelnen Stoffe ist unterschiedlich lang und charakteristisch, wodurch eine zeitliche Trennung der Substanzen in der Probe erfolgt, die dadurch nacheinander in einem Detektor gemessen werden können.

Praxis: Es wurden 200 ml der zu analysierenden Zellsuspension (Pflanzenzell-, Bakterien- oder Mischkultur aus beiden) unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert. Die Pflanzenzell- und die Mischkulturen wurden zuvor durch ein feinmaschiges Sieb gegossen und an der Wasserstrahlpumpe über ein Filterpapier abgenutscht, um größere Zellaggregate abzutrennen und danach bei 6000 U/min abzentrifugiert. Bakterielle Reinkulturen hingegen wurden ohne weitere Vorbehandlung bei 10000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in sterile 500 ml Erlenmeyerkolben überführt und für die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Für die SPE wurden Disposable Extraction Columns (DEC) der Firma *Baker* (Bakerbond spe<sup>TM</sup>) verwendet. Das Packungsmaterial bestand aus dem gleichen Material, das auch in der HPLC-Säule benutzt wurde (C<sub>18</sub>) und das, wie die Vorversuche bestätigt hatten, für die Aufreinigung von IAA geeignet war. Die Überstände der Kulturen wurden über ein Vakuum durch die DEC gezogen, die im Anschluß 2 Mal mit 6 ml HPLC-reinem Wasser gespült wurden. Auf diese Weise wurden Reste, die nicht an das Packungsmaterial gebunden hatten, abgespült. Die gebundenen Substanzen wurden mit 10 ml eines Eluats, das zu 40 % aus Methanol und zu 60 % aus 1 %igen Eisessig bestand, gelöst und in einem Meßzylinder aufgefangen. Diese 10 ml waren die Probe, die für die HPLC-Analyse verwendet wurde.

10 µl dieser Lösung wurden in den Injektor eingespritzt und mit dem Eluat (40 % Methanol und 60 % 1 %iger Eisessig) bei einer Pumpleistung von 1 ml/min und

einem Säulendruck von 220 bar durch die Säule gepreßt. Bei der Säule handelte es sich um eine Reverse Phase Säule der Firma *Machery und Nagel* (Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub>). Die Messung der Substanzmengen erfolgte im UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 278 nm und wurde über einen Integrator als Zeigerausschlag ausgegeben. Der Peak für die IAA entstand im equilibrierten System nach 7,9 min, was anhand der Eichreihen mit reinen IAA-Lösungen ermittelt wurde.

### 2.5.3 Isotopenverdünnungsmethode für <sup>15</sup>N

(Newton et al. 1953; Fiedler and Proksch 1975)

Theorie: Das <sup>15</sup>N ist ebenso wie das <sup>14</sup>N ein natürlich vorkommendes Stickstoffisotop. Beide Isotope sind stabil und unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften nicht. Physikalisch hingegen sind die Isotope zu unterscheiden, wodurch der Anteil beider Isotope in einem Gas quantifizierbar wird. In der natürlichen Gasatmosphäre beträgt der <sup>15</sup>N-Gehalt 0,3663 atom% N. Durch diese Eigenschaften eignet sich das Isotop <sup>15</sup>N, um als Tracer bei der Durchführung der Isotopenverdünnungsmethode eingesetzt zu werden.

Praxis: Die Kalluskulturen wurden für 3 Kulturperioden auf MSHe<sub>(S)</sub> kultiviert, bei dem die stickstoffhaltigen Medienbestandteile KNO<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, im Vergleich zum natürlichen Vorkommen, einen erhöhten Anteil des Isotopes <sup>15</sup>N enthielten. Im KNO<sub>3</sub> waren 5,1 und im NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10,5 atom% <sup>15</sup>N. Da die Pflanzenzellen für den Aufbau von Zellmasse gebundenen Stickstoff benötigten und die Isotope <sup>14</sup>N und <sup>15</sup>N unselektiv, d.h. gleichberechtigt aufgenommen wurden, reichert sich die Zellmasse, im Vergleich zum natürlichen Gehalt, signifikant mit <sup>15</sup>N an.

Dieser Gehalt an <sup>15</sup>N wurde bestimmt und bildete den Ausgangswert für die Isotopenverdünnungsmethode.

Die Untersuchungen wurden in Pflanzenröhren durchgeführt, die mit 40 ml stickstofffreiem MSHe<sub>(L)</sub> befüllt wurden. Dieses Medium wurde mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* beimpft, so daß sich ca. eine OD<sub>578</sub> von 0,1 einstellte und eine Starterdosis von 0,12 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugeführt. Diese (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Menge wurde in vorangegangenen Experimenten als optimale

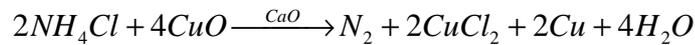
Starterdosis für die Stickstoff-Fixierung durch *Gluconacetobacter diazotrophicus* in MSHe<sub>(L)</sub> detektiert. Auf die Medienoberfläche wurde eine Silikonscheibe aufgelegt, auf der der mit <sup>15</sup>N angereicherte Kallus ausgelegt wurde. Dadurch, daß für das weitere Wachstum kein gebundener Stickstoff zur Verfügung stand, waren die Pflanzenzellen auf die Fixierung durch die Bakterien angewiesen. Die Gasatmosphäre in den Pflanzenröhren entsprach der natürlich vorkommenden auf der Erde, wodurch die diazotrophen Bakterien fast ausschließlich <sup>14</sup>N fixierten, der auf diesem Weg den Pflanzen zugänglich wurde. Die Aufnahme dieses fixierten Stickstoffs hatte zur Folge, daß der erhöhte Anteil des <sup>15</sup>N-Isotopes an der Zellmasse, das durch die Vorbehandlung angereichert worden war, wieder reduziert, sprich verdünnt wurde. Diese Verdünnung des Isotopes wurde durch die <sup>15</sup>N-Bilanzierung bestimmt.

#### 2.5.4 <sup>15</sup>N-Bilanzierung

Theorie: Zur Detektion des <sup>15</sup>N-Gehaltes einer Probe muß der Stickstoff gasförmig vorliegen. Dafür wird der gebundene Stickstoff durch den „Semimakrokjeldahl“ in Ammonium und anschließend in der modifizierten Dumasreaktion in molekularen Stickstoff umgewandelt. Die N<sub>2</sub>-Moleküle werden im Emissionsspektrometer (NOI 5) angeregt und emittieren daraufhin Licht, das durch ein Prisma in seine Spektralbanden aufgespalten wird. Die physikalischen Unterschiede zwischen den Isotopen <sup>14</sup>N und <sup>15</sup>N bewirken, daß jedes der zweiatomigen Moleküle im Bereich der Wellenlängen 297-299 nm eine charakteristische Spektralbande erzeugt. Für das Molekül <sup>28</sup>N<sub>2</sub> liegt diese bei 297,7 nm, für <sup>29</sup>N<sub>2</sub> bei 298,3 nm und für <sup>30</sup>N<sub>2</sub> bei 298,9 nm. Die Intensität der einzelnen Banden steht im Verhältnis zur Konzentration des Moleküls in der Probe.

Praxis: Es wurden 7,5 µg Stickstoff (Kalkulation durch vorherige enzymatische Ammoniumbestimmung) als Festprobe in ein Anregungsröhrchen aus Quarzglas eingewogen. Zusätzlich wurde CuO und CaO, wobei letzteres zuvor bei 1000° C für mindestens 18 h getrocknet wurde, im Überschuß ins Röhrchen gegeben. In dem Anregungsröhrchen wurde über eine Vakuumpumpe ein Vakuum von ca.

3 torr erzeugt und dann zugeschmolzen. Die Dumasreaktion erfolgte innerhalb von 18-24 h bei 560° C.



Das getrocknete CaO wurde eingesetzt, um entstehendes CO<sub>2</sub>, CO, Cu und Wasserdampf zu binden, die ansonsten die Messung hätten behindern können.

Nach dem Abkühlen wurden die Röhrchen in das NOI 5 gestellt und im Hochfrequenzfeld angeregt. Die angeregten Elektronen auf den Außenschalen wurden dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn diese Elektronen wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückfielen, gaben sie die zuvor aufgenommene Anregungsenergie wieder ab. Die Druck-Lichtemissionskurve für N<sub>2</sub> besagt, daß die abgegebene Energie zu 100 % als Licht emittiert wird, wenn der Druck 3 torr beträgt. Die Lichtintensitäten der charakteristischen Banden wurden mit einer Photozelle detektiert und ausgegeben, wodurch die Gehalte an <sup>14</sup>N und <sup>15</sup>N berechnet werden konnten.

$$Atom\% \ ^{15}N = \frac{100}{2 \cdot R + 1} \qquad R = \frac{Peakhöhe^{28}N \cdot Verstärkungsbereich(2)}{Peakhöhe^{29}N \cdot Verstärkungsbereich(1)}$$

### 2.5.5 Gesamtstickstoffbestimmung

Nasse Veraschung durch den „Semimakrokjeldahl“

(Bremner 1965, modifiziert nach Bergersen 1980, Stein 1997)

Theorie: Organischer und mineralischer Stickstoff wird durch heiße, konzentrierte Schwefelsäure naß verascht. Die Reaktion wird durch Selen katalysiert. Die Veraschung findet bei 330° C über eine Zeit von mindestens 30 min statt, während der der gesamte gebundene Stickstoff mit Ausnahme des Nitrats und Nitrits zu Ammonium konvertiert wird. Das Ammonium wird enzymatisch quantifiziert.

Praxis: Der Aufschluß erfolgte in 50 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff, die zuvor jeweils mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure für 15 min bei 330° C ausgekocht worden waren. Während des Auskochens wurden die Erlenmeyerkolben mit

zugeschmolzenen Glastrichtern verschlossen, an denen die verdampfte Flüssigkeit kondensierte und in den Kolben zurücktropfte. Nach dem Abkühlen wurden die Kolben mit HPLC-reinem Milli-Q<sub>plus</sub> Wasser gespült und getrocknet. Der für diese Analyse benötigte 10 ml Standzylinder und das 20 ml Becherglas wurden auf gleiche Weise behandelt und stickstofffrei gemacht, wie zuvor für die Kolben beschrieben. Dann wurde das Aufschlußreagenz hergestellt. Dafür wurden 0,5 g metallisches Selen und 50 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, das zur Erhöhung des Siedepunktes auf 330° C führt, in 500 ml konzentrierter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst und für 4 Stunden auf 350-400° C erhitzt. 10-20 mg der getrockneten Kallusproben wurden in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 10 ml des Aufschlußreagenzes, sowie 1 ml 35 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Der Aufschluß erfolgte bei 330° C auf dem Ceranfeld.

Nach der Abkühlung des Kolbens wurde der Glastrichter mit 500 µl des Aufschlusses unter Rückfluß in den Kolben abgespült. Der Aufschluß wurde durchmischt und 500 µl in ein 20 ml Becherglas mit 3 ml HPLC-reinem Wasser überführt. Die Lösung (Neutralisat) wurde dann mit 25 %iger NaOH auf einen pH von 6,0 (± 1,0) eingestellt. Anschließend wurde das Volumen des Neutralisats im Meßzylinder bestimmt und für die enzymatische Ammoniumbestimmung eingesetzt.

### **2.5.6 Enzymatische Ammoniumbestimmung**

(Boehringer, UV-Test, Nr. 1112732)

Theorie: Im Verlauf der Reaktion wird Ammonium zu Glutamat umgesetzt und im gleichen Maße NADH zu NAD oxidiert. NADH ist hierbei die Meßgröße und wird photometrisch detektiert.

Praxis: Der Ablauf der Bestimmung ist dem Beipackzettel des Testkits zu entnehmen.

### 2.5.7 Proteinbestimmung

(modifiziert nach Goa 1953)

Theorie: Die Bestimmung des zellulären Proteins in den Suspensionen basierte auf der Biuretreaktion, die mit Benedict's-Reagenz erfolgte. In den Ansätzen mit Pflanzenzellen wurde die Suspension zuvor bis zur optischen Konstanz gepottert, d.h. bis im Photometer kein Drift des Meßwertes zu erkennen war (2.4.3), reine Bakteriensuspensionen konnten ohne Vorbehandlung analysiert werden.

Die Bestimmung folgte dem Prinzip, daß Protein durch die Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) isoelektrisch gefällt wurde. Durch Natriumhydroxid (NaOH) wurde das Protein resuspendiert und die Suspension alkalisiert, was die Voraussetzung für die Farbreaktion durch das Benedict's-Reagenz war. Die Farbreaktion erfolgte durch die Anlagerung des Kupfersulfats an die Peptidbindung, wobei es zur Bildung des rotviolett gefärbten Biurets kam.

1 ml Bakteriensuspension und 330 µl TCA wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, gut geschüttelt und ruhen gelassen. Nach 10 min. wurde das Reaktionsgefäß in einer Eppendorftischzentrifuge 2 min. zentrifugiert und anschließend der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde dann in 1 ml NaOH vollständig resuspendiert und daraufhin mit 50 µl Benedict's-Reagenz versetzt. 15 min. später erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 330 nm am Einstrahlphotometer. Die Messung wurde gegen H<sub>2</sub>O (Leerwert), das auf die gleiche Weise behandelt wurde wie die Proben, ausgeführt.

Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte mittels einer Eichgeraden, die mit 5 verschiedenen Konzentrationen Rinderserumalbumin (Serva, Nr. 11920) von 10-400 µg/l hergestellt wurde. Es wurden die Konzentrationen 10, 50, 100, 200 und 400 µg/l eingesetzt. Durch diese Eichgerade konnte die gemessene Extinktion der Proben in Proteingewicht umgerechnet werden.

### 2.5.8 Saccharose-, Glucose-, Fructosebestimmung

(Boehringer, Nr. 716260)

Die Bestimmungen der Saccharose, Glucose und Fructose wurden unter Verwendung des enzymatischen Testkits der Firma *Boehringer* durchgeführt. Die Probenbehandlung, sowie die theoretischen und praktischen Grundlagen sind dem Beipackzettel des Testkits zu entnehmen.

## 2.6 Pathogenreaktionsquantifizierung

Die Pathogenantwort von Pflanzen richtet sich gegen pathogene Mikroorganismen, die versuchen in die Pflanze einzudringen und sich dort zu etablieren. Einige Mechanismen der Phytopathogenantwort, die sich aus einer Vielzahl verschiedener Reaktionen zusammensetzt, können gemessen werden.

### 2.6.1 Alkalisierungstest

Theorie: Der Alkalisierungstest ermöglicht eine Messung der Pathogenantwort von Pflanzenzellen in Zellsuspensionen auf elicitierende Substanzen. Diese Pathogenantwort bewirkt eine Alkalisierung des Außenmediums und wird den schnellen Pathogenantworten (Felix et al. 1992) zugeordnet. Die pH-Änderungen wurden mit einer Elektrode der Firma *Ingold*, Urdorf gemessen.

Praxis: Für die Alkalisierungsmessungen wurden Suspensionskulturen verwendet, die 3-4 Tage zuvor auf frisches MSHe<sub>(L)</sub> passagiert worden waren. Die Kultur wurde im Tag-/Nachtrhythmus von 16 h bei 28 °C, 8 h bei 20 °C und 79 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verwendeten Zelldichten lagen zwischen 150 und 250 mg/ml. 50 ml dieser Suspensionen (ca. 8 g Zellmasse) wurden in ein 50 ml Becherglas überführt, in dem die Zellen für 30 sec sedimentierten. Danach wurde der Überstand auf 20 ml abgezogen, das Becherglas auf den Schüttler gestellt und bei 120 U/min geschüttelt. Dann wurde der HE zugegeben (Konzentrationen sind den Experimenten im Ergebnisteil zu entnehmen) und die pH-Werte alle 3-5 min gemessen. Für diese Messungen wurden jeweils 2 ml des Überstandes in ein Schraubdeckelgläschen pipettiert und die pH-Elektrode in die Flüssigkeit

eingetaucht. Nach der Messung wurde der Inhalt des Gläschens wieder in das Becherglas mit der Hauptsuspension zurückgegeben.

### **2.6.2 Luminol/Kaliumhexacyanoferratmethode für die Analysen der Lumineszenz**

Theorie: Als eine Komponente der Pathogenantwort von Pflanzenzellen entsteht der „oxidative burst“, dessen Hauptprodukt  $H_2O_2$  ist.

Dieses entstehende  $H_2O_2$  oxidiert in Anwesenheit des Katalysators Kaliumhexacyanoferrat Luminol, was in einer Lichtemission resultiert. Die Lichtemission kann in einem Luminometer detektiert werden.



Praxis: Pflanzensuspensionskulturen, die 3 Tage zuvor auf frisches MSHe<sub>(L)</sub> passagiert worden waren, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Nutsche durch einen Rundfilter abgenutscht. Das Gewicht des Zellmaterials auf dem Filter wurde auf der Analysenwaage bestimmt und 1 g des Frischgewichtes in 8 ml VIM (2.1.3) in einem 20 ml Becherglas resuspendiert. Das Becherglas wurde dann bei 200 U/min geschüttelt. Nach 3 h wurde dann der HE (Konzentrationen aus den Experimenten im Ergebnisteil entnehmen) appliziert und ca. jede 5 min eine Probe gemessen. Die Messungen erfolgten in Glasküvetten im Luminometer. In den Küvetten wurden jeweils 175  $\mu$ l Kaliumphosphatpuffer (KPI) und 25  $\mu$ l Kaliumhexacyanoferrat-Lösung vorgelegt und 50  $\mu$ l Überstand der Zellsuspension aus dem Becherglas zupipettiert. Dann wurde die Küvette in das Luminometer gestellt und 25  $\mu$ l der Luminol-Lösung (10,7 mg Luminol in 50 ml KPI) durch ein Septum in die Küvette gespritzt. Die Meßwerterfassung erfolgte bei 25° C Betriebstemperatur. Es wurden 10 Mal nacheinander (10 Meßzyklen) die Anzahl der emittierten Photonen gemessen, die in einem Zeitintervall von 5 sec entstanden waren. Der maximale Wert eines Meßzykluses wurde für die Ergebnisdarstellungen verwendet.

### 2.6.3 Messung der Beladungsfähigkeit von Süßkartoffelzellen mit verschiedenen AM-Farbstoffen für eine Quantifizierung des cytosolischen Calciumlevels

#### a) Fluo-4 und Ca-Green

Theorie: Die Zellen der Süßkartoffel *Ipomoea batatas* werden mit AM-Farbstoffen beladen und bei einer Wellenlänge von 499 nm mit einem Laser angeregt. Die daraufhin entstehende Fluoreszenz, die mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle korreliert, wird bei einer Wellenlänge von 516 nm mit einer CCD-Kamera im Fluoremetric Imaging Plate Reader (FIIPR) erfaßt und quantifiziert.

Praxis: Suspensionskulturen der Süßkartoffel wurden im Dunklen kultiviert, wodurch die Autofluoreszenz der Pflanzenzellen minimiert wurde. 4 Tage vor dem Experiment erfolgte eine Passage auf frisches MSHe<sub>(L)</sub>. Die Kulturen wurden dann, nach Zugabe eines der AM-Farbstoffe Fluo-4 oder Ca-Green in den Konzentrationen 1 oder 2  $\mu\text{M}$ , für 60 min bei 30° C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde jedes Well der 96-Welltiterplatten mit 200  $\mu\text{l}$  Suspension befüllt und die Platte in den FIIPR gestellt. Über einen Laser wurden die Suspensionen mit dem Farbstoff angeregt und die resultierende Fluoreszenz mit der CCD-Kamera aufgenommen und gemessen.

#### b) Fura-AM

Theorie: Pflanzensuspensionen werden mit Fura-AM beladen. Dann wird eine Einzelzelle im Mikroskop fokussiert und die entstehende Fluoreszenz in dieser Zelle mit einer CCD-Kamera gemessen. Es wird im ständigen Wechsel bei zwei Wellenlängen (360 und 390 nm) gemessen. Die Werte werden über ein Kalkulationsprogramm in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle umgewandelt.

Praxis: Im Dunklen kultivierte Zellsuspensionen der Süßkartoffel wurden für 30 min mit 0,2  $\mu\text{M}$  Fura-AM inkubiert. Dann wurde eine intakte Zelle unter dem Mikroskop fokussiert und die Zelle vorsichtig mit PBS abgespült. Das Spülen wurde so lange fortgesetzt, bis das meßbare Signal, das mit der CCD-Kamera aufgenommen wurde, bei beiden Wellenlängen konstant blieb.

#### 2.6.4 Kulturröhrenversuche

Für diese Experimente wurden Glaskulturröhren mit 120 ml Volumen verwendet. In jede Kulturröhre wurden eine Teflonscheibe gehängt, die über Nähgarn am oberen Röhrenrand befestigt wurde. Die Teflonscheibe hatte einen etwas geringeren Durchmesser als das Röhreninnere und berührte die Wandungen nicht. Die Röhren wurden mit gasdurchlässigen Silikonschwammkappen verschlossen, die das Garn mit der daran hängenden Teflonscheiben so fixierten, daß das Fadenende frei außen am Röhrchen hing. Dadurch konnte die Höhe, in der sich die Teflonscheibe befand, nachträglich verändert werden. Die Kulturröhren wurden separat vom Medium autoklaviert und danach mit 40 ml des sterilen Mediums befüllt. Dann wurden für die Experimente mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Vorkulturen des Endophyten auf MSHe<sub>(L)</sub> abzentrifugiert (10000 U/min, 15 min, JA-14), der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml sterilem Medium, das bei dem jeweiligen Versuch eingesetzt wurde, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wurde 3 Mal wiederholt. Anschließend wurde jedes Kulturröhrenmedium mit der Menge Bakteriensuspension inokuliert, die benötigt wurde, um eine OD von ca. 0,1 im Medium einzustellen. Als letztes wurde die Teflonscheibe unter der Sterilbank aus der Kulturröhre gezogen und Kallus von MSHe<sub>(S)</sub> darauf ausgelegt. Dann wurde die Teflonscheibe wieder abgesenkt und die Kulturröhre so mit der Silikonschwammkappe verschlossen, daß die Teflonscheibe auf der Medienoberfläche auflag. Gewichtsbestimmungen an der Analysenwaage wurden nach jedem Arbeitsschritt, dem Autoklavieren der Kulturröhren, dem Befüllen mit Medium, der Inokulation mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* und dem Auslegen des Kallus vorgenommen. Über diese Gewichte wurden die Inokulations- und Medienmengen bestimmt. Aus diesem Grunde mußte während der gesamten Prozedur darauf geachtet werden, daß die Teflonscheiben nicht abgelegt wurden, wodurch Medium verloren gehen konnte und die Inokulationsmengen verfälscht worden wären.

### 2.6.5 Schüttelkolbenexperimente mit Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam

Die Untersuchungen wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml MSHe<sub>(L)</sub> durchgeführt. Das Medium wurde vorgelegt und im Kolben bei 121° C für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums wurde die OD<sub>578</sub> einer 6-10 Tage alten Suspensionskultur bestimmt, die sich zu diesem Zeitpunkt in der optimalen Wachstumsphase befand. Es wurde die Menge an Suspension unter der Sterilbank abgenommen, die benötigt wurde, um in den 100 ml frischem Medium die für das jeweilige Experiment erforderliche OD<sub>578</sub> einzustellen. Die abgenommene Suspension wurde unter sterilen Bedingungen auf ein Filterpapier in einer Porzellannutsche gegeben und an der Wasserstrahlpumpe abgenutscht. Die Zellen, die dann auf dem Filterpapier zurückblieben, wurden unter vorsichtigem Schwenken in dem frischen Medium resuspendiert. Die Kolben wurden danach mit gasdurchlässigen Silikonstopfen verschlossen und in einem Tag-/Nacht rhythmus von 16 h Licht bei 28° C und 8 h Dunkelheit bei 24° C, sowie einer gleichbleibenden Luftfeuchtigkeit von 79 % kultiviert. Die Probenahme erfolgte mit einer abgesägten Glaspipette, deren Aufnahmeöffnung durch das Abschneiden der Pipettenspitze vergrößert worden war, um die Scherkräfte und damit die Beschädigung der Pflanzenzellen beim Aufsaugen zu minimieren. Das Probevolumen betrug 5 ml, von denen 1 ml für die Vitalitätsbestimmung (2.3.5) verwendet wurde. Die restlichen 4 ml wurden im Handpotter bis zur optischen Konstanz gepottert und anschließend die OD<sub>578</sub> (0,5 ml) (2.4.3), die Gesamtzellzahl (0,5 ml) (2.4.2), das zelluläre Protein (1 ml) (2.5.7) und das Frischgewicht (2 ml) (2.4.1) der Pflanzenzellen bestimmt.

## 2.7 Modifikationen des Multiplen Chemostaten (MC) und Fermenterläufe

### 2.7.1 Multipler Chemostat

Der MC ist ein Chemostatensystem, das aus 5 Kulturgefäßen besteht, die entweder einzeln oder alle simultan benutzt werden können. Ursprünglich wurde die Apparatur zur Kultivierung von Bakterien und zur Herstellung von Gradienten in Kulturmedien entwickelt. Die Kulturgefäße bestehen aus Glas und werden mit Stahldeckeln versehen, die durch Metallschnellverschlüsse auf dem Gefäß fixiert werden. Die Stahldeckel haben mehrere Öffnungen, die der Aufnahme verschiedener Einheiten dienen, die für die kontinuierliche Kultivierung von Bakterien notwendig sind. Diese Einheiten werden alle unter Verwendung von Dichtungen in die Deckel eingeschraubt, wodurch später die Sterilität und damit die kontaminationsfreie Kultivierung gewährleistet wird. In jedem Deckel können ein Probenahmeseptum, ein Medienz- und Suspensionsablauf, ein Säure-/Basezulauf, Zuluft, Abluft, sowie die pH- und Sauerstoffelektrode installiert werden.

Über die Medienz- und Ablaufeinheit wird frisches Medium aus dem Vorratsgefäß in das Kulturgefäß und Suspension aus dem Kulturgefäß in die Ablaufflasche gepumpt. Durch die Zuluft wird die Menge synthetische Luft ins Medium eingebracht, die nötig ist, um die mit der Sauerstoffelektrode gemessenen Istwerte mit den definierten Sollwerten abzugleichen. Die Abluft dient dem Druckausgleich und wird über einen autoklavierbaren Sterilfilter (*Satorius*, Göttingen) aus dem Gefäß geleitet. Der Säure-/Basezulauf und die pH-Elektrode bildet die letzte Einheit. Die pH-Elektrode mißt den pH-Istwert in der Suspension und entsprechend des geforderten Sollwertes wird entweder 5 %ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$  oder 5 %ige KOH aus Vorratsflaschen ins Kulturgefäß gepumpt. Bei der pH-Elektrode und der Sauerstoffelektrode handelt es sich um Produkte der Firma *Ingold*, Urdorf.

Die Steuerung des MC erfolgt durch einen Computer mit einem selbstgeschriebenen Steuerungsprogramm. Die Meßwertausgabe kann alternativ

analog oder digital erfolgen. Die Temperierung der Suspension wird durch eine Heizschlange vorgenommen, die durch den Deckel in das Kulturgefäß hineinragt und durch die Wasser, das zuvor in einem externen Wasserbad erwärmt wird, geleitet wird.

Die Kultur wird durch Rührer in Bewegung gehalten, die über Magneten unterhalb der Kulturgefäße beschleunigt werden.

### 2.7.2 Vorbereitung eines Chemostatenlaufes

Vor jedem Chemostatenlauf wurden die pH-Elektroden mit dem Steuerungsprogramm kalibriert. Die folgenden Schritte wurden nacheinander für jede der 5 Elektroden durchgeführt. Anfangs wurde die Elektrode in eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7,0 getaucht und das Potentiometer manuell auf 0 Volt abgeglichen. Dann wurde die Elektrode in eine Pufferlösung mit dem pH 4,0 gestellt. Das Potentiometer wurde daraufhin manuell über die Stellschraube für den  $\Delta$ pH auf -40 justiert. Diese beiden Schritte wurden 3 Mal wiederholt und die jeweils 3. Kalibrierwerte wurden in der Eichwertdatei (eich.dat) abgespeichert und für die Experimente verwendet. Nach dem dritten Durchgang wurde die Pufferlösung des pH 7,0 am MC gemessen und bei Abweichungen von mehr als 0,1 pH wurde das komplette pH-Kalibrierprogramm für die betreffende Elektrode wiederholt. Lag die Abweichung innerhalb der Toleranzen, wurde das Kulturgefäß mit 0,5 l Medium befüllt.

Das Glaskulturgefäß wurde mit einem Metalldeckel versehen und durch einen Schnellverschluß verschlossen. Im Deckel waren die pH Elektrode, die Sauerstoffelektrode, der Medienzufluß, der Medienabfluß, die Säure und Basezuläufe, die Temperierschlange und die Abluft verschraubt. Bis auf den Gasaustritt (Druckausgleich) wurden alle Schläuche mit Verbindung ins Kulturgefäß mit Schlauchklemmen verschlossen und die Schlauchschnellverbinder in Aluminiumpapier eingewickelt. Dann wurden die 5 Kulturgefäße inklusive aller Elektroden und Zu- und Ablaufeinheiten in der speziell angefertigten Autoklavierhilfe bei 121° C für 20 min autoklaviert. Die Autoklavierhilfe ist eine Metallkonstruktion, auf die der komplette Gradostat unter

optimaler Platzausnutzung befestigt werden kann. Sie dient zum Transport der Anlage und wird während des Autoklavierens eingesetzt.

Nach dem Autoklavieren wurden die pH-Elektroden und Sauerstoffelektroden mit dem Verstärker verbunden, worauf eine Polarisationszeit von mindestens 6 h folgte, bevor die Sauerstoffelektroden kalibriert werden konnten.

Für die Kalibrierung wurde der Zuluftschlauch mit der Begasungseinheit verbunden und das Medium mit reinem Stickstoff gespült. Bei gleichbleibendem Zeigerausschlag am Potentiometer wurde der Zeiger auf 0 gestellt, was eine 0 %ige Sauerstoffsättigung im Medium bedeutete. Dann wurde synthetische Luft (80 % N<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub> v / v, Linde, Hannover) in das Medium geleitet, bis der Zeigerausschlag wieder konstant blieb. Der Zeiger wurde mit der Stellschraube für die Steilheit auf 100 eingestellt. Dies bedeutete 100 %ige Sauerstoffsättigung im Medium, oder auch 20 % gelöster Sauerstoff. Diese Prozedur wurde 3 Mal wiederholt und jeweils die Werte des letzten Kalibrierdurchganges in der „eich.dat“ gespeichert und für die Experimente verwendet. Dann wurden die Zuluftschläuche wieder von den Begasungseinheiten und die Elektroden von dem Verstärker getrennt und die Kulturgefäße mit der Autoklavierhilfe unter die Sterilbank gestellt. Hier erfolgte die Inokulation mit Pflanzensuspensionen und/oder Bakteriensuspensionen. Für Pflanzenzellkulturen wurde ein Inokulum von 400 ml einer Kultur gewählt, die 8-10 Tage zuvor auf frisches MSHe<sub>(L)</sub> passagiert worden war und sich in der optimalen Wachstumsphase befand. Das Frischgewicht (2.4.1) mußte mindestens 50 mg/ml betragen. Das Inokulat wurde zuvor fluoreszenzmikroskopisch auf Vitalität (2.3.5) überprüft.

Dann wurden die Säure- und Baseflasche über die Schlauchschnellverbinder steril mit dem Kulturgefäß verbunden, wodurch der Chemostat für die Inokulation vorbereitet war. Das Inokulum des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* bestand aus einer 3 Tage alten Vorkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>, die 3 Mal unter den Bedingungen, wie in den Kulturröhrenversuchen (2.6.4) beschrieben, zentrifugiert und resuspendiert wurde. Mit dem Inokulum wurde eine OD von 0,1 im Medium eingestellt. Dann wurde die Autoklavierhilfe mit den Kulturgefäßen auf den MC zurückgestellt, die Elektroden mit dem Verstärker, die Gaszufuhr mit der

Begasungseinheit, sowie die Medienz- und Suspensionsabläufe, sowie die Säure- und Basezuläufe mit den Vorratsgefäßen verbunden.

### 2.7.3 Chemostatenlauf

Es wurden Vorkulturen von *Ipomoea batatas* auf dem Rundschtüttler bei 150 U/min und vorherrschenden Bedingungen von 16 h Tagphase mit 28° C, 8 h Nachtphase bei 20° C und 79% Luftfeuchtigkeit angezogen. Durch Verdünnungsausstriche auf MSHe<sub>(S)</sub> wurde die Reinheit jeder Kultur vor dem Einsatz im MC überprüft. Pflanzliche Vorkulturen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 400 ml Zellsuspension angezchtet. Die Vorkultur wurde vor der Inokulation in den autoklavierten Chemostaten 30 sek ruhen gelassen, damit sich größere Zellaggregate am Boden absetzen. Der „Suspensionsüberstand“ wurde durch den Impfstutzen unter der Sterilbank ins Kulturmedium gegeben. *Gluconacetobacter diazotrophicus* wurde ebenfalls unter den zuvor beschriebenen Bedingungen vorkultiviert. Dies geschah in 300 ml Erlenmeyerkolben, die 200 ml MSHe<sub>(L)</sub> enthielten. Der Endophyt wurde nach 48 h, wenn eine deutliche Trübung eingetreten war, abzentrifugiert, das Pellet in wenig Medium, das für das Experiment verwendet wurde, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dies wurde 3 Mal wiederholt und danach die OD<sub>578</sub> bestimmt. Es wurde die Menge in das Kulturgefäß des MC inokuliert, die für eine OD von 0,1 benötigt wurde. Bei Mischkulturen mit *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* wurden die Bakterien erst 4 Tage nach den Pflanzenzellen inokuliert, damit sich die Pflanzenzellen bereits einige Tage an die neuen Bedingungen anpassen konnten und von den Bakterien nicht überwachsen wurden.

Dann wurden die Medienzulaufpumpen bei drei verschiedenen Laufleistungen kalibriert, um die Durchflußraten während der Experimente für jedes Gefäß exakt einstellen zu können. Die Kulturen wurden anfangs unter statischen Bedingungen (Batch-Kultur) inkubiert. Die Reinkulturen wurden auf kontinuierliche Kultur umgeschaltet, nachdem ein deutliches Wachstum der Zellen (Trübung) in der Suspension zu erkennen war. Für die Pflanzenzellkulturen war dies in der Regel

nach 4-6 Tagen, für *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup> nach ca. 48 h der Fall. Die Mischkulturen wurden 24 h nach der Inokulation von *Gluconacetobacter diazotrophicus* (5. Tag) auf kontinuierliche Kultur umgeschaltet.

Das Umschalten erfolgte, indem eine 10 l Reservoirflasche mit autoklaviertem Medium und eine Ablaufflasche des gleichen Fassungsvermögens über sterile Schlauchschnellverbinder mit den Kulturgefäßen verbunden wurden. Über die kalibrierten Pumpen wurde dann eine definierte Menge frischen Mediums pro Minute kontinuierlich in die Kulturgefäße gepumpt, und gleichzeitig wurde die gleiche Menge Suspension aus dem Gefäß abgepumpt.

Über das Computerprogramm und die Steuereinheiten wurden die Temperatur (28° C), der pH-Wert (5,8) und der Sauerstoffgehalt in der Suspension (20 %) während des Versuches geregelt.

#### **2.7.4 Probenahmebedingungen**

Die Probenahmen erfolgten jeweils nach 3 Voluminawechseln im Kulturgefäß. Dazu wurden die Kaskadengefäße, die in die Ablaufschläuche inseriert waren, unter die Sterilbank gestellt und aus ihnen wurden die Proben mit sterilen, abgesägten Glaspipetten abgenommen. Das Probevolumen betrug 10 ml. Für die Bestimmung der Pflanzenzellmasse wurde 2 Mal 1 ml der Probe für Vitalitätsbestimmung (2.3.5) verwendet und 8 ml der Probe gepottert, die als Homogenisat für die Messung der OD<sub>578</sub> im Photometer eingesetzt wurden (2.4.3). Einen Volumenwechsel später wurde auf die gleiche Weise eine weitere Probe entnommen und ebenfalls die OD<sub>578</sub> bestimmt. Wenn die Ergebnisse der 2. Bestimmung um weniger als 3 % von denen der vorherigen abwichen, galt dies als stabiles Fließgleichgewicht (Steady-State). 3 Voluminawechsel reichten im allgemeinen aus, um das Steady-State zu erreichen, doch wenn die OD<sub>578</sub> beider Proben um mehr als 3 % voneinander divergierten, wurde jeweils einen Volumenwechsel später eine weitere Probe entnommen, bis die Unterschiede zweier aufeinander folgender Proben innerhalb der akzeptablen Toleranz von 3 % lagen. Diese letzte Probe wurde dann für weitere Analysen und Bestimmungen verwendet.

Es wurde ein Probevolumen von 20 ml genommen. 3 Mal 1 ml wurden für die Proteinbestimmung (2.5.7) eingefroren, die zu einem späteren Zeitpunkt mit den gesammelten Proteinproben der verschiedenen Experimente durchgeführt wurde. Ebenfalls 3 Mal 1 ml wurden für die Saccharose-, Glucose- und Fructosebestimmungen (2.5.8) eingefroren, nachdem sie für 2 min in der Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand danach in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt worden war. Jeweils 1 ml wurden für die Bestimmungen der  $OD_{578}$  (2.4.3) und der Gesamtzellzahlbestimmung (2.4.2) verwendet. Ein Volumen von 10 ml Probe wurde an der Wasserstrahlpumpe über einen Rundfilter abgenutscht. Die Zellen auf dem Filter dienten der FG Analyse (2.4.1) und wurden danach für die Vitalitätsbestimmung (2.3.5) in entsprechender Menge resuspendiert. Das Filtrat wurde zur Messung des pH-Wertes und der Osmolarität des Mediums benutzt.

Die Probenahme für die Bakteriensuspensionen verliefen genau so, wie es zuvor für die Pflanzenzellsuspensionen beschrieben wurde. Die Probenahme erfolgte ebenfalls im Steady-State, allerdings mußten die Proben für die Analysen nicht gepottert werden. Es wurde die  $OD_{578}$  (2.4.7), der Proteingehalte (2.5.7), die Saccharose-, Glucose- und Fructosekonzentration (2.5.8) und die CFU (2.4.5) bestimmt.

### 3 Geräteentwicklung für die Pflanzenzellkultivierung

Es wurde eine Apparatur entwickelt, die eine erfolgreiche Kultivierung von suspendierten Pflanzenzellen in kontinuierlicher Kultur ermöglichte. Für dieses Chemostatensystem wurde der Gradostat (Fritsche et al. 1990) als Basisgerät verwendet. In einer vorangegangenen Arbeit wurde dieser Gradostat zu einem Chemostatensystem mit fünf separat steuerbaren Kulturgefäßen umgebaut (Kalippke 1996). Diese als „multipler Chemostat“ bezeichnete Fermentereinheit wurde für die Kultivierung von Bakterien, im speziellen für *Gluconacetobacter diazotrophicus* eingesetzt, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Für die kontinuierliche Kultivierung mußten einerseits bauliche Veränderungen an der Anlage, andererseits Anpassungen der Software vorgenommen werden. Weitere Modifikationen, die der benutzerfreundlichen Handhabung dienten, wurden während des Einsatzes der Anlage deutlich und in Kulturpausen eingebaut.

#### 3.1 Bauliche Veränderungen

Die zentralen Probleme bei der Kultivierung von Pflanzenzellen waren deren Zellgröße und die damit verbundene Anfälligkeit gegenüber Scherkräften. Die Adaption des Chemostatensystems an diese aus der Bakterienkultivierung unbekannt Probleme fand durch folgenden Maßnahmen statt:

- Konstruktion eines neuen Kulturgefäßes
- Installation einer basalen Gasversorgung
- Modifikation des Inokulationsstutzens und der Ablaufeinheit
- Integration von Probenahmegefäßen
- Entwicklung eines Unterdrucksystems zum Abpumpen der Kultursuspension
- Addition einer Beleuchtungseinheit

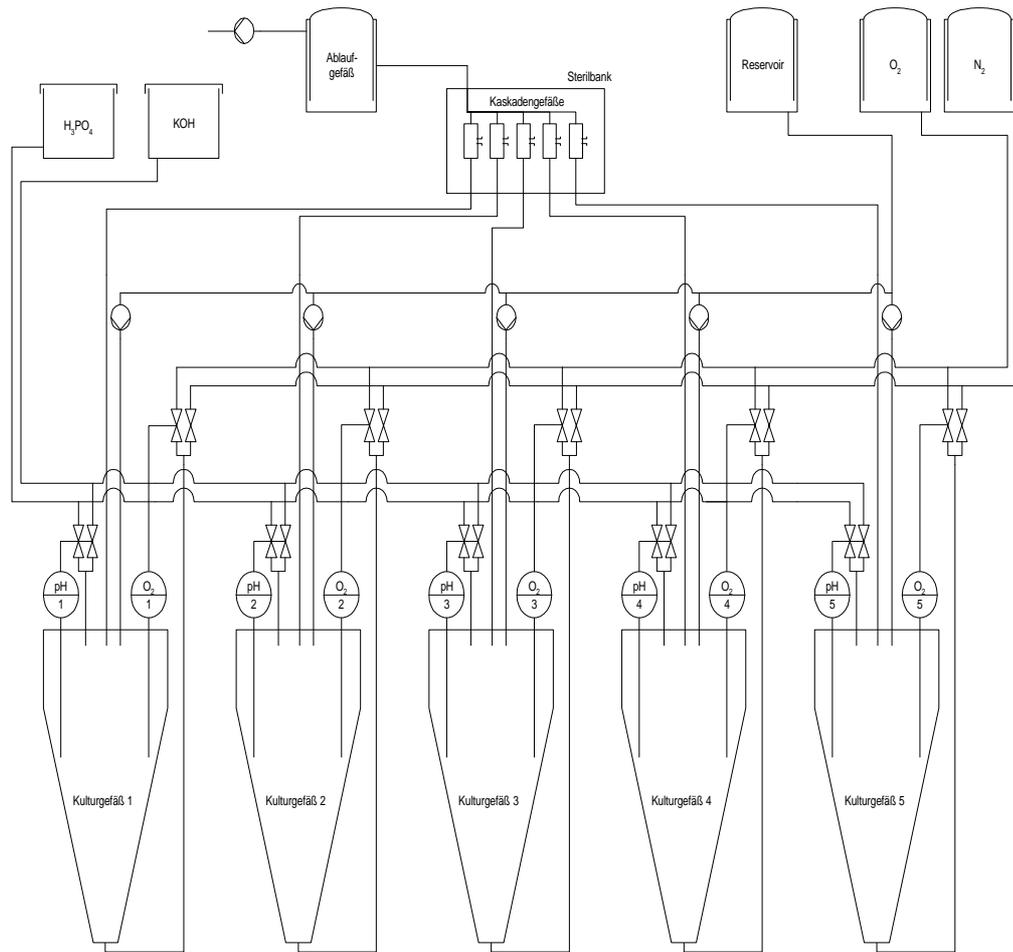
Die Konstruktion des neuen Kulturgefäßes und die Installation der basalen Gasversorgung wurden notwendig, weil die Pflanzenzellen durch das Rührwerk des bisher verwendeten Systems zerschlagen wurden. Dadurch, daß das Rührwerk nicht nur der Bewegung der Kultur, sondern auch dem Zerschlagen der ins Kulturgefäß eingebrachten Gasblasen und damit dem Gaseintrag ins Medium diente, konnte kein Konsens zwischen den Ansprüchen Pflanzenzellkultivierung und effektive Gasversorgung gefunden werden. Daher wurde ein neues Kulturgefäß gebaut, das zum Boden hin konisch zusammenläuft und in einer Glasfritte der Porengröße 0,2 µm endet. An diese Fritte ist eine Schlaucholive angesetzt, an die die Gasversorgung angeschlossen wird. Die Glasfritte bewirkt zwei Effekte, einerseits ist die Porengröße so gering, daß keine Zellen, nicht einmal Bakterien, sie passieren können, andererseits wird das anströmende Gas beim Durchtritt in kleinste Gasblasen zerteilt. Die dadurch vergrößerte Oberfläche des Gases erhöht die Phasengrenze zur Suspension und damit wurde ein besser Eintrag ins Medium erreicht. Die Homogenität der Suspension wurde durch das vertikal aufsteigende Gas im Zentrum des Kulturgefäßes erreicht. Dieses Prinzip eines Airliftfermenters bewirkt, daß die Zellen in der Mitte des Gefäßes vom Gasstrom erfaßt und zur Medienoberfläche transportiert werden. Dort werden sie von dem nachfolgenden Medium in die Peripherie des Gefäßes gedrückt und sinken am Rand langsam ab. Spätestens am Boden, der aus der Glasfritte besteht, werden sie wieder vom Gasstrom erfaßt und erneut zur Medienoberfläche transportiert. Dadurch konnte das Rührwerk eingespart werden.

Die Modifikation des Inokulationsstutzens und der Ablaufeinheit wurden durch die Größe der Pflanzenzellen im Vergleich zu Bakterien notwendig. Die beiden Einheiten, die sich im Gefäßdeckel befinden, wurden auf einen Durchmesser von 6 mm vergrößert, um einen ungehinderten Durchfluß der Pflanzenzellen zu gewährleisten. Bei dieser Größe wurde ein Verstopfen und eine Beschädigung intakter Zellen ausgeschlossen.

Die Integration eines Probenahmegefäßes, Kaskadengefäß (Kalippke 1996), ermöglicht die Probenahme unter einer an den MC angegliederten Sterilbank. Die Kaskadengefäße sind in den Ablaufschlauch inseriert und minimieren das

Kontaminationsrisiko der Hauptkultur während der Probenahme. Zum einen wird die Probe im keimfreien Raum unter der Sterilbank genommen, zum anderen werden mögliche Kontaminanten durch die Kaskade am zurück wachsen in die Hauptkultur gehindert und als drittes wird das Kaskadengefäß turnusmäßig mit jeder Ablaufflasche erneuert. Dadurch konnte die kontaminationsfreie Kulturdauer der Einzelansätze mehr als verdoppelt werden.

Die Entwicklung eines Unterdrucksystems zum Abpumpen der Kultursuspension wurde durch die veränderte Probenahme notwendig. Dadurch, daß die Probenahme erst im Ablaufschlauch aus dem Kaskadengefäß erfolgte, konnte keine Schlauchpumpe vorgeschaltet werden, denn die Pflanzenzellen wären beim Passieren der Pumpe zerquetscht worden. Schlauchpumpen eignen sich ohnehin wenig für Pflanzensuspensionen, denn aufgrund niedriger Laufleistungen verstopfen die Schläuche vor den Pumpen durch angesammeltes Zellmaterial. Speziell in diesem System ist der Ablaufschlauch durch die verbesserte Probenahme sehr lang, wodurch Schlauchpumpen ineffektiv werden. Entweder reicht die Pumpleistung für diese Distanzen nicht aus, oder die Belastung des Schlauches in der Pumpe ist so groß, daß seine Lebensdauer sehr kurz ist. Eine programmierbare Vakuumpumpe, die hinter die Ablaufflasche geschaltet wird, bietet eine Alternative. Die Pumpe, die an den Deckel der Ablaufflasche angeschlossen ist, produziert ein Vakuum in der Flasche und im Ablaufschlauch inklusive Kaskadengefäß und saugt auf diese Weise Zellsuspension durch einen Ablaufstutzen aus dem Kulturgefäß ab. Dieser Stutzen ragt durch den Deckel in das Gefäß und regelt gleichzeitig das Suspensionsniveau. Ein Gasfilter der Porengröße 0,2 µm zwischen Pumpe und Ablaufgefäß gewährleistet die Sterilität des Systems.



**Abb. 3.1** Konstruktionsschema des MC

Für die Aufrechterhaltung des Tag-/Nachtrhythmuses während der Kultivierung im Chemostaten wurden Lampen vor den Kulturgefäßen angebracht, die über eine Zeitschaltuhr automatisch an- und abgeschaltet wurden.

### **3.2 Softwareentwicklung zur Steuerung des MC**

Die Anzucht von Zellkulturen mit Hilfe des MC fordert die Umsetzung bestimmter Funktionen durch die Software, um einen optimalen Prozeßablauf realisieren zu können. Dazu zählen im einzelnen:

- Messung und Regelung des pH-Wertes der Zellsuspension
- Messung und Regelung des Sauerstoffgehaltes in der Zellsuspension
- Ausgabe der Meßwerte an verschiedene Medien
- Speicherung der Meßwerte
- Benutzerführung durch die Software

Das optimierte Programm des MC basiert auf dem des Gradostaten (Fritsche 1990), und ist in der Programmiersprache Pascal geschrieben.

Vor dem Eintritt in den eigentlichen Programmumlauf wird eine „guide-line“ aufgerufen, die ein Protokoll über den Benutzer anfertigt. Das Protokoll beinhaltet:

- Name des Benutzers
- Bezeichnung des Experiments
- Benennung der Meßwertdatei zur Datensicherung
- Intervall der Speicherzeiten
- Definition der im Experiment verwendeten Elektroden

Die wesentliche Aufgabe der „guide-line“ besteht darin, den Benutzer in die Lage zu versetzen, den MC ohne lange Einarbeitungszeit in Betrieb zunehmen.

Die Schnittstelle zwischen der Software und dem Benutzer bzw. Anwender bildet eine Box mit Kippschaltern. Die acht Kippschalter dieser Box sprechen verschiedene Prozeduren der Software direkt an. Die Schalterstellungen definieren folgende Prozeduren:

**Tab. 3.1 Zuordnung zwischen Kippschalter und auszuführender Prozedur**

Kippschalter	Prozedur
1	Aufruf des Auswahlmenüs
2 + 6	Sollwertausdruck
3	Speichern in Meßwertdatei
4	Fehlerausgabe löschen
5 + 6	Fehlerausdruck
6	Druckerfreigabe
7	Schnellkalibrierung
8	Programmende

Das Programm des MC besteht neben der beschriebenen "guide-line" aus einer Programmschleife die zyklisch alle 30 sek. durchlaufen wird. Die Abbildung 3.2 zeigt den Programmablaufplan des MC in der Übersicht.

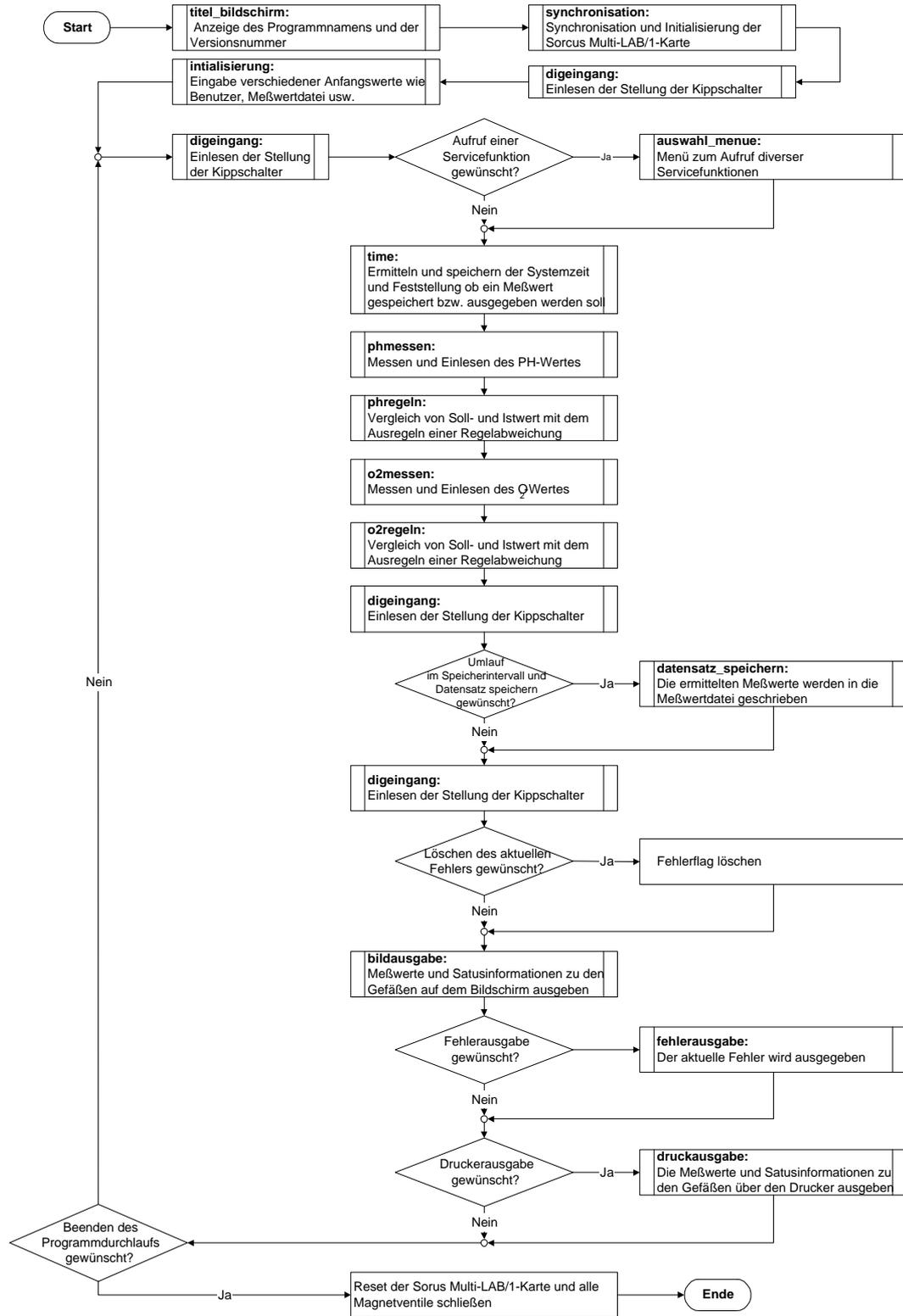


Abb. 3.2 Programmablaufplan des MC

Der Programmablauf kann in die folgenden Komponenten unterteilt werden:

1. Der Programmstart mit der "guide-line" und den Prozeduren titel\_bildschirm, synchronisation, digeingang und initialisierung
2. Der Programmumlauf mit
  - dem optionalen Aufruf diverser Servicefunktionen durch die Prozedur auswahl\_menu
  - dem Ermitteln der Zeit durch die Prozedur time
  - dem Messen und Regeln des pH-Wertes durch die Prozeduren phmessen und phregeln
  - dem Messen und Regeln des Sauerstoffwertes durch die Prozeduren o2messen und o2regeln
  - der optionalen Speicherung der Meßwerte durch die Prozedur datensatz\_speichern
  - der Ausgabe der Meßwerte auf dem Bildschirm durch die Prozedur bildausgabe
  - der optionalen Fehlerausgabe durch die Prozedur fehlerausgabe
  - der optionalen Ausgabe der Meßwerte über den Drucker durch die Prozedur druckausgabe
3. Dem Programmende mit dem Verlassen des Programmumlaufts und anschließenden Herunterfahren der Anlage

Im folgenden werden einige der oben beschriebenen Komponenten bzw. Prozeduren detaillierter beschrieben.

#### *Das Auswahlmenü:*

Mit dem Setzen des Kippschalters 1 (Tab 3.1) wird aus dem Programmumlauf in das Auswahlmenü (Abbildung 3.3) verzweigt.

Das Auswahlmenü bietet dem Benutzer eine Vielzahl von Funktionen für die Änderung der Einstellungen des MC. Diese werden durch die Software zur Verfügung gestellt und durch Eingabe des entsprechenden Buchstabens über die

Tastatur ausgeführt. Die ersten vier Auswahlpunkte betreffen die Anlage des MC, die beiden letzten die Verwaltung der Meßwerte.

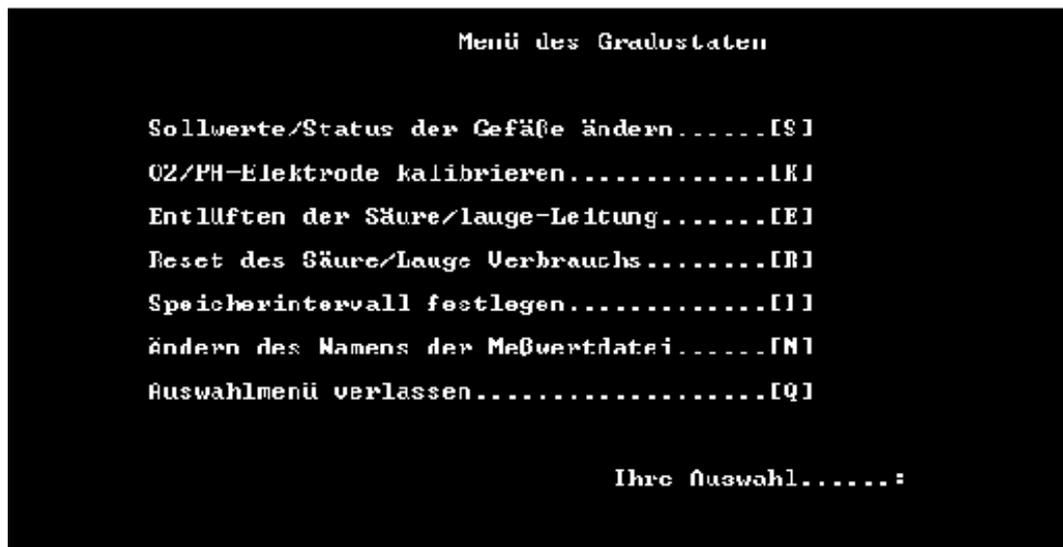


Abb. 3.3 Auswahlmenü des MC

[S]: Es können neue Kulturgefäße in Betrieb genommen werden und/oder die Sollwerte der in Betrieb befindlichen Kulturgefäße geändert werden. Beim Abschalten eines Kulturgefäßes wird die Gaszufuhr aus sicherheitstechnischen Gründen unterbrochen.

[K]: Während des Kalibrierens werden die aktuellen Arbeitspunkte (Nullpunkt und Steigung) der zu kalibrierenden Elektrode ermittelt und in das entsprechende Parameterfeld in der Datei „messwert.dat“ gespeichert. Diese digitalen Werte werden für die Kalkulationen der Istwerte in den Kultursuspensionen verwendet.

Der Kalibriervorgang besteht aus einem sich wiederholenden Abgleich des Nullpunktes und der Steigung. Dies resultiert aus der gegenseitigen Beeinflussung von Nullpunkt und Steigung.

Der Kalibriervorgang für die

#### pH-Elektrode:

Zu Beginn wird mit einem technischen Puffer pH 7 der Nullpunkt kalibriert. Hierfür wird der Zeigerausschlag mit dem Nullpunkt-Potentiometer manuell auf 0 Skalenteile gestellt. Anschließend

wird die Steigung mit einem technischen Puffer pH 4,01 kalibriert. Dazu wird mit dem Steigungs-Potentiometer ein Skalenwert von -40 eingestellt. Dieser Vorgang wird 3 Mal wiederholt, wobei mit dem letzten Durchlauf die Werte in das Programm übernommen werden.

Sauerstoffelektrode:

Zu Beginn wird durch Zugabe von reinem Stickstoff der Nullpunkt auf 0 % kalibriert. Mit dem Nullpunkt-Potentiometer wird auch diesmal manuell auf 0 Skalenteile abgeglichen. Synthetische Luft wird eingesetzt, um den Maximalauschlag von 100 Skalenteilen (100 %) zu erzeugen. Dieser Ausschlag entspricht Sauerstoffgehalt von 20 % oder 22,4  $\mu\text{mol}$  gelöstem Sauerstoff in einem Liter Flüssigkeit. Dieser Vorgang wird ebenfalls 3 Mal wiederholt, wobei auch hier mit dem letzten Durchlauf die Werte in das Programm übernommen werden.

Um Drift und Shift der Elektroden zu berücksichtigen, werden die Kalibrierung der Elektroden vor jeder Inbetriebnahme durchgeführt.

Für die schnelle Inbetriebnahme der einzelnen Elektroden ist in die Software ein sogenannter Schnellkalibriermodus implementiert. Dieser wird durch den Kippschalter 7 (Tab 3.1) aktiviert. Der Schnellkalibriermodus kann auch zur Kontrolle des Nullpunktes und der Steigung während lang andauernder Versuche genutzt werden.

[E]: Entlüftet die Säure/Base-Leitungen, die nach dem Autoklavieren mit Luft gefüllt sind, indem Säure oder Base aus den Vorratsflaschen eingeleitet wird. Die Magnetventile, die während des normalen Programmumlaufs nur 0,5 sek pro Meßzyklus geöffnet sind, werden hierfür geöffnet, bis sich der Silikonschlauch mit der entsprechenden Flüssigkeit gefüllt hat. Dadurch wird mit der ersten Regelung der pH-Wert im Kulturgefäß korrigiert und es ergibt sich keine Verzögerung durch Luft im Schlauch.

[R]: Setzt die Zähler für den Säure bzw. Basenverbrauch zurück.

[I]: Das benutzerdefinierte Speicherintervall ermöglicht es, prägnante Kulturphasen äußerst detailliert zu protokollieren und weniger interessante Phasen mit nur wenigen Meßwerten zu versehen. Dadurch kann die

Datenmenge reduziert werden, ohne auf eine hohe Auflösung in den Kernzeiten verzichten zu müssen. Die Änderung des Intervalls kann jederzeit, während jeder Kulturphase vorgenommen werden.

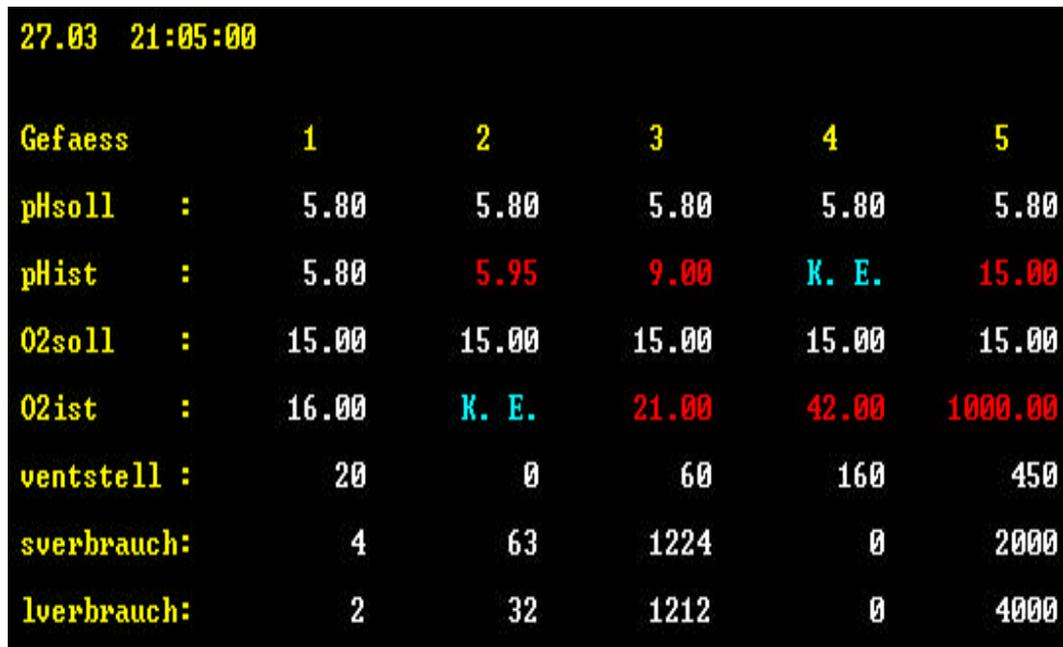
[N]: Legt nach der Eingabe des Namens eine neue Textdatei an, in der die Werte vom Zeitpunkt der Änderung an abgespeichert werden. Dies geht in der Regel mit einer Änderung der Kulturbedingungen einher, wodurch eine Ordnung der Daten vereinfacht wird.

[Q]: Schließt das Auswahlmeneü und verzweigt wieder in den Programmumlauf

#### *Die Meß- und Regelprozeduren:*

Nach dem Messen des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes in der Kultursuspension werden die gemessenen Digitalwerte in die entsprechende physikalische Größe umgerechnet. Anschließend wird durch den Soll-Istwert-Vergleich die Regelabweichung bestimmt. Überschreitet die Regelabweichung das eingestellte Toleranzband, so werden durch den Regelalgorithmus geeignete Maßnahmen für die Korrektur eingeleitet.

#### *Die Bildschirmausgabe:*



	1	2	3	4	5
<b>27.03 21:05:00</b>					
<b>Gefaess</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>pHsoll :</b>	5.80	5.80	5.80	5.80	5.80
<b>pHist :</b>	5.80	5.95	9.00	K. E.	15.00
<b>O2soll :</b>	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
<b>O2ist :</b>	16.00	K. E.	21.00	42.00	1000.00
<b>ventstell :</b>	20	0	60	160	450
<b>sverbrauch:</b>	4	63	1224	0	2000
<b>lverbrauch:</b>	2	32	1212	0	4000

Abb. 3.4 Bildschirmausgabe während eines Chemostatenlaufes

Die Abbildung 3.4 zeigt, wie die Größen Soll- und Istwert für den pH-Wert und den Sauerstoffgehalt, den Säuren- und Basenverbrauch und die Ventilstellung der einzelnen Kulturgefäße auf dem Bildschirm dargestellt werden. Die Aktualisierung dieser Größen erfolgt in jedem Programmumlauf, d.h. alle 30 sek ein Mal. Die Istwertausgabe von 15 für den pH-Wert und 1000 für den Sauerstoffgehalt zeigen unkalkulierbare Meßwerte und damit Unregelmäßigkeiten an. Istwerte innerhalb der gewählten Bandbreite werden weiß, die außerhalb der einfachen Bandbreite hellrot und die außerhalb der doppelten Bandbreite hellrot blinkend dargestellt. Nicht angeschlossene Elektroden werden mit K.E. (keine Elektrode) in hellblau gezeigt.

*Das Speichern der Meßwerte:*

Das Speichern der Meßwerte ist eine optionale Funktion und wird durch das Umschalten des Kippschalters 3 (Tab. 3.1) aktiviert.

Mit dem Aktivieren dieser Funktion werden die Meßwerte entsprechend der eingestellten Intervallzeit in die angegebene Meßwertdatei gespeichert. Das Format der Meßwertdatei ist das einer Textdatei mit der Endung .txt. Dies hat den Vorteil, daß die Ziffern im ASCII-Code gespeichert sind, wodurch der Import in die üblichen Tabellenkalkulationsprogramme (z.B. Excel oder Origin) ohne Probleme möglich ist.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Medienoptimierung für die Pflanzenzellen**

In diesem Teil der Doktorarbeit wurde die optimale Zusammensetzung des Mediums zur Initiierung und Kultivierung von Kalluskulturen aus mikroorganismenfreien Süßkartoffelpflanzen untersucht. Die Ansprüche an das Medium waren, einerseits eine möglichst hohe Wachstumsrate der Kalluszellen zu erreichen und andererseits einen möglichst weichen Kallus zu entwickeln, der sich für die Herstellung von Suspensionskulturen besser eignet als feste Zellverbände.

#### **4.1.1 Hormonkombination**

Es wurde ein Kompletmedium nach Murashige and Skoog als Basismedium verwendet, dem verschiedene Hormonkombinationen aus Auxinen und Cytokininen zugesetzt wurden. Die verwendeten Auxine waren die natürlich vorkommenden Indol-3-acetic-acid (IAA) und Indol-3-butyric-acid (IBA), sowie das synthetische Auxin Naphtalene-acetic-acid (NAA). Die Cytokinine waren Benzylaminopurin (BAP), Zeatin und Kinetin. Die Hormone wurden jeweils in der Konzentration von 1 mg/l eingesetzt.

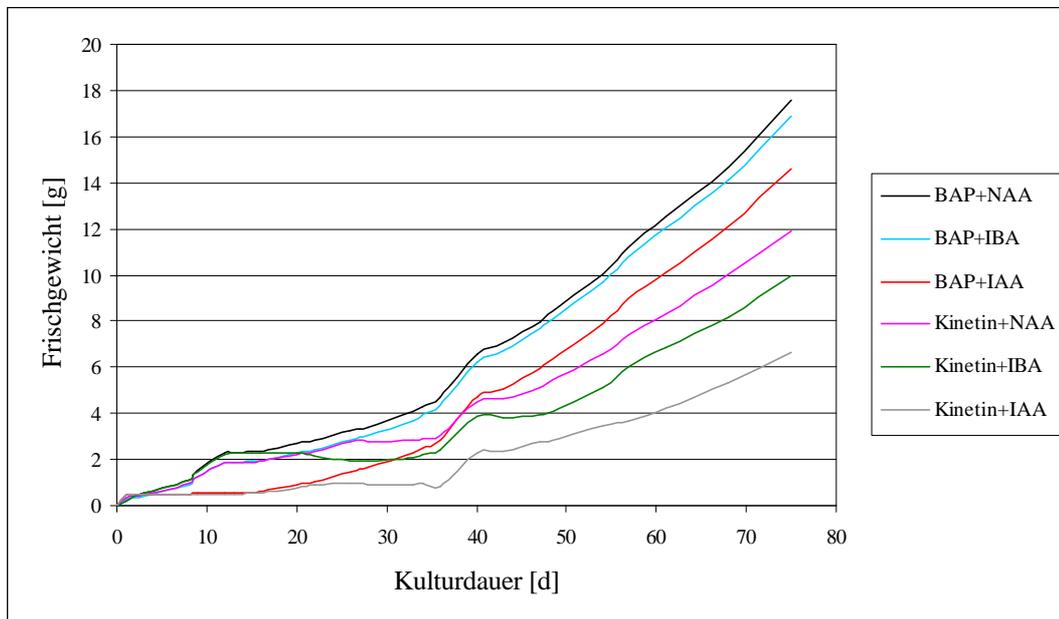
Es wurde das Wachstum der Kalluszellen untersucht, wofür die Zunahme der FG (2.4.1) nach 20 Tagen im Vergleich zum Inokulum als Bestimmungsparameter verwendet wurde. Zusätzlich wurde die Konsistenz der Kalli zu diesem Zeitpunkt überprüft.

**Tab. 4.1 Kontrolle des Kalluswachstums auf MSHe<sub>(S)</sub> mit verschiedenen Hormonkombinationen.**

	IAA	IBA	NAA
BAP	W / w	W / w	W / w
Kinetin	W / h	W / h	W / h
Zeatin	k W	k W	k W

Legende: Wachstum (W), kein Wachstum (k W), weich (w), hart (h)

Die Induktion von Kalluskulturen aus Sproßmeristemen der Süßkartoffel konnte bei sechs der neun getesteten Medien erfolgreich durchgeführt werden. Nur auf den Medien mit Zeatinzugabe entwickelten sich keine undifferenzierten Zellen, woraufhin diese Medien wurden für die Untersuchung der Zellmassenzunahme nicht weiter verwendet wurden. Auf den anderen sechs, auf denen sich Kalluszellen entwickelt hatten, wurden die Zunahmen der FG (2.4.1) analysiert.



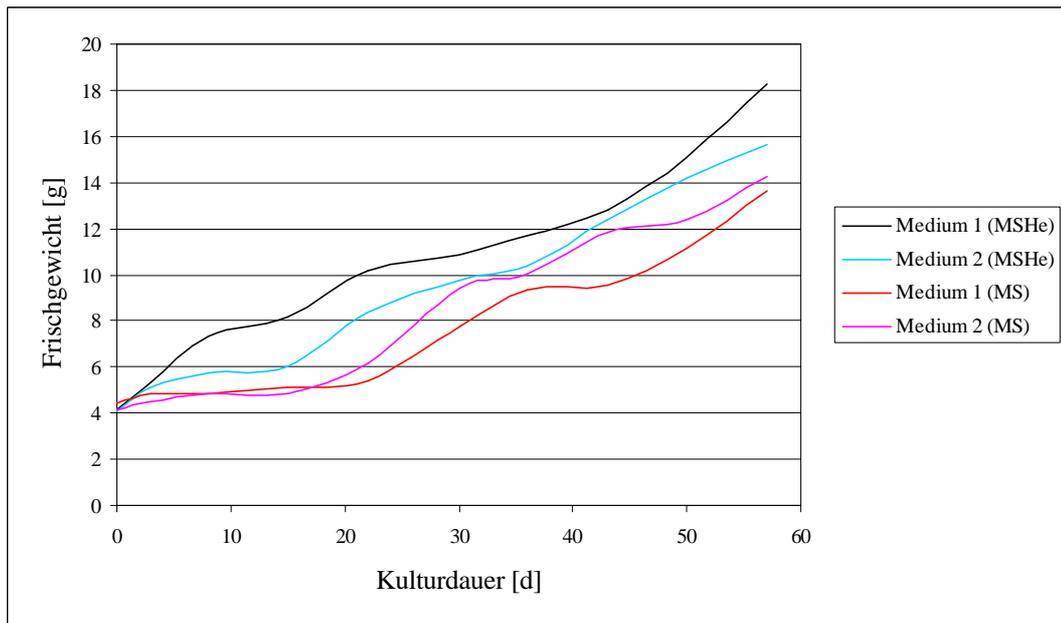
**Abb. 4.1 Einfluß der Hormonkombination im MSHe<sub>(S)</sub> auf das Wachstum der Kalluszellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.**

Die Frischgewichte der Kalluskulturen nahmen auf den Medien mit dem Cytokinin BAP am schnellsten zu und entwickelten die höchsten Gesamterträge. Bei der Kombination dieses Cytokinins mit dem synthetischen Auxin NAA oder mit IBA wurden die höchsten FG erzielt. Der Ertrag auf dem Medium mit BAP und IAA lag nach 75 Kulturtagen um ca. 2 g niedriger. Die Gewichtszunahmen auf den Medien mit dem Cytokinin Kinetin waren geringer als die auf denen mit BAP, doch der Einfluß der Auxine auf das Wachstum war gleich. Die Kalluskulturen wuchsen auch auf Kinetin am besten, wenn NAA als Auxin im Medium vorhanden war, mit IBA war das Frischgewicht zu Versuchsende etwas geringer und die schlechtesten Ausbeuten wurden in Kombination mit IAA erzielt.

Für die weiteren Experimente wurden zwei Medienkompositionen bezüglich der Hormone verwendet. Zum einen wurden BAP und NAA, zum anderen BAP und IBA in den Konzentrationen 1 mg/l eingesetzt. Diese Hormonkombinationen sorgten einerseits für das beste Zellwachstum unter den getesteten Medien und induzierten eine weiche Form des Kallus.

#### **4.1.2 Makro- und Mikroelemente**

Zur Optimierung des Kalluswachstums auf den Festmedien wurde die Zusammensetzung der Mikroelemente variiert. Ein Ansatz enthielt sowohl die Makro- als auch die Mikroelemente nach Murashige and Skoog (MS), der andere die Makroelemente nach Murashige and Skoog und die Mikroelemente nach Heller (MSHe). Die Hormonkombination in den Medien 1 bestand aus BAP und NAA, die in den Medien 2 aus BAP und IBA.



**Abb. 4.2** Einfluß der Mikroelementekomposition im Festmedium auf das Wachstum des Kallus von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Die FG-Zunahme der Kalluskulturen auf  $MSHe_{(S)}$  lag die gesamte Experimentdauer (57 Tage) stetig über der der Kulturen, die auf den MS-Medien angezchtet wurden. Auch in dieser Untersuchung wurde bestätigt, daß die Hormonkombination BAP und NAA im  $MSHe_{(S)}$  effektiver für das Wachstum auf diesem Festmedium war, als die Zugabe von BAP und IBA. Auf den MS-Medien war der Einfluß genau umgekehrt. Für die weiteren Experimente dieser Arbeit wurde das  $MSHe$ -Medium verwendet.

## 4.2 Analyse der optimalen Parameter für die Kultivierung von Suspensionskulturen der Süßkartoffel

In diesem Abschnitt wurden die Ansprüche der suspendierten Kalluszellen unter Berücksichtigung verschiedener Parameter untersucht, um die günstigsten Kulturbedingungen für Suspensionskulturen der Süßkartoffel zu definieren. Die Experimente wurden unter statischen Bedingungen in Batch-Kultur durchgeführt.

Das Zellwachstum der Pflanzenzellen in Suspension wurde durch die Messung der  $OD_{578}$  (2.4.3) bestimmt.

#### 4.2.1 Inokulationsdichte

Es wurden verschiedene Mengen Zellmaterial aus einer Hauptkultur in frisches Medium transferiert und darüber Zelldichten von 2 % (w/v) (20 g/l), 1 %, 0,5 %, 0,1 % und 0,05 % in den Suspensionskulturen eingestellt. Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch bei 578 nm bestimmt (2.4.3).

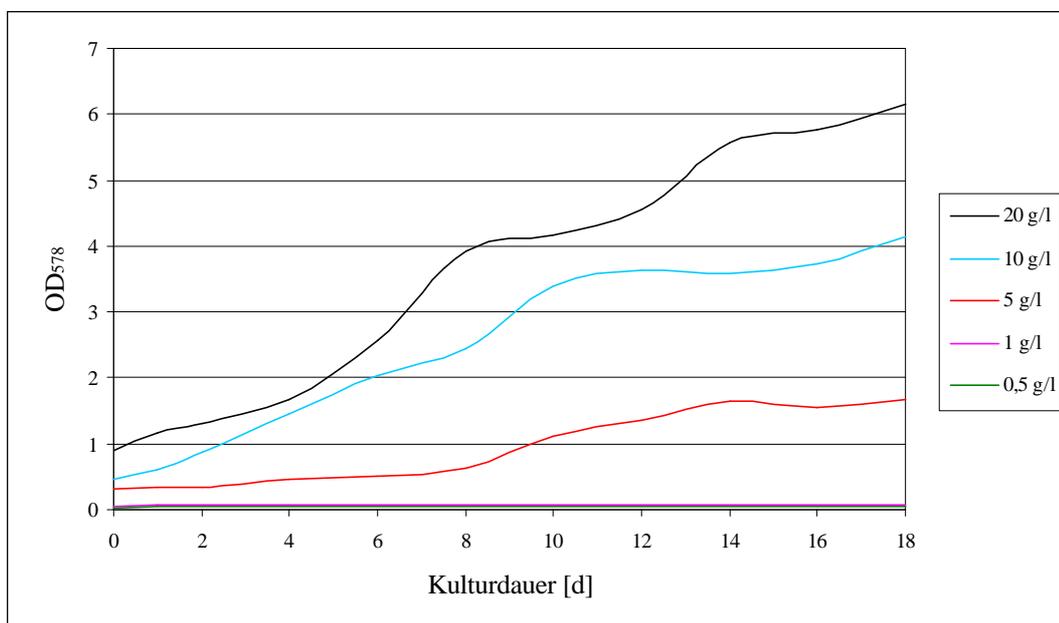
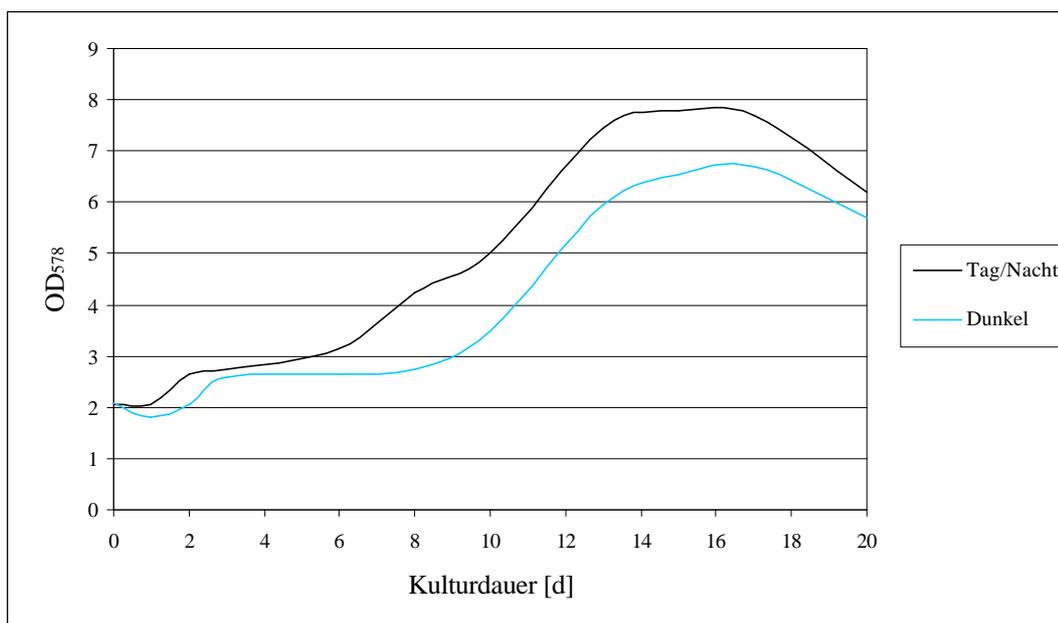


Abb. 4.3 Einfluß der Inokulationsdichte auf das Wachstum der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>.

Die Kulturen mit 2 %iger Animpfdichte wuchsen bereits nach wenigen Tagen und erreichten die größte Zelldichte aller Ansätze. Die Kultur mit 1 %iger Animpfdichte zeigte einen ähnlich Wachstumsverlauf, wie die des 2 %igen Ansatzes, blieb jedoch deutlich unter dessen Maximalwerten. Bei 0,5 % Zellmasse im Medium nahm die  $OD_{578}$  kaum noch zu. In diesem Bereich befand sich minimale Animpfdichte, die nicht unterschritten werden durfte, damit die Zellen in der Kultur wuchsen. Bei den beiden Ansätze mit geringeren Inokulationsdichten konnte kein Wachstum festgestellt werden.

### 4.2.2 Tag-/Nachtrhythmus

Zum Vergleich der Abhängigkeit der Suspensionskulturen der Süßkartoffel von einem Tag-/Nachtrhythmus wurde in 100 ml MSHe<sub>(L)</sub> in einem 250 ml Erlenmeyerkolben eine Zelldichte von 2 % (v/w) eingestellt. Ein Teil der Kolben wurde in der Klimakammer bei 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, mit einer Tagestemperatur von 28° C und einer Nachttemperatur von 24° C kultiviert, die anderen Suspensionen wurden im Dunklen bei 28° C inkubiert.

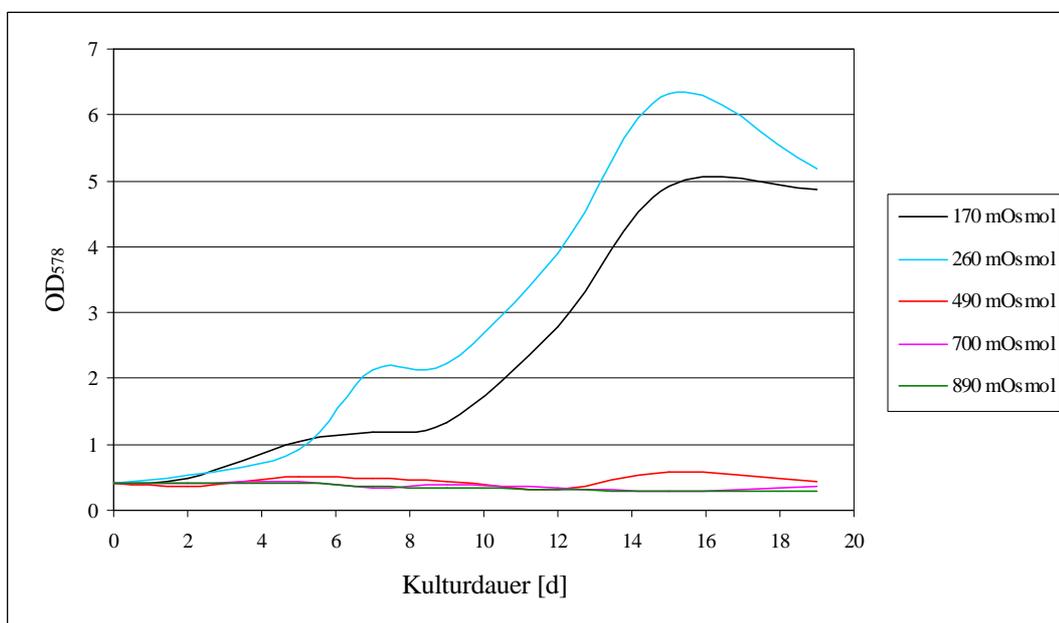


**Abb. 4.4** Einfluß des Tag-/Nachtrhythmuses auf das Wachstum der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>.

Die Kultur im Tag-/Nachtrhythmus zeigte ein besseres Wachstum, als die Suspension, die in der Dunkelheit inkubiert wurde. Ob dieser Effekt auf den Lichtverhältnissen, den Temperaturänderungen in den Hell-/Dunkelphasen, oder auf der Summe beider Parameter beruhte, wurde nicht weiter analysiert. Die höheren Erträge in den Zellsuspensionen im Tag-/Nachtrhythmus führten zum Einsatz dieser Kulturbedingung in den weiteren Experimenten.

### 4.2.3 Osmolarität des Mediums

Es wurden MSHe<sub>(L)</sub> Medien hergestellt und die Osmolarität dieser Medien durch die Zugabe von gepuffertem Malat eingestellt. Das Originalmedium (2.1.1) besaß eine Osmolarität von 260 mOsmol und durch Zugabe der organischen Säure Malat wurde diese in den entsprechenden Ansätzen auf 490, 700 und 890 mOsmol erhöht. Das Malat wurde dabei durch 1 M KOH abgepuffert. Für die Einstellung der Osmolarität von 170 mOsmol wurde eine geringere Menge Malat als im Originalmedium eingesetzt.



**Abb. 4.5** Einfluß der Osmolarität des MSHe<sub>(L)</sub> auf das Wachstum der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur.

Die optimale Osmolarität des Kulturmediums lag bei 260 mOsmol. Bei dieser Medienzusammensetzung begann das meßbare Zellwachstum am 5. Tag. Die maximale OD<sub>578</sub> dieser Zellsuspension lag bei 6,33 (15. Tag), was einem Frischgewicht von 536 g/l entsprach. Die Zellen im 170 mOsmolaren Medium zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten, doch das Wachstum setzte erst am 8. Tag ein, was für eine längere Anpassungsphase an das Medium sprach. Der Maximalwert der OD<sub>578</sub> betrug in dieser Kultur 4,925, was einem Frischgewicht

von 415 g/l entsprach. Die Kulturen in den Medien mit höherer Osmolarität als das Originalmedium wuchsen nicht.

#### 4.2.4 pH-Toleranz

Zur Untersuchung der pH-Toleranz der Süßkartoffelzellen in Suspensionskultur wurden jeweils 100 ml MSHe<sub>(L)</sub> in 250 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und auf fünf unterschiedliche pH Werte eingestellt (4,5; 5,2; 5,8; 6,5; 7,2). Das Wachstum der Kulturen wurde über die Bestimmung der OD<sub>578</sub> bis zum 20. Kulturtag gemessen.

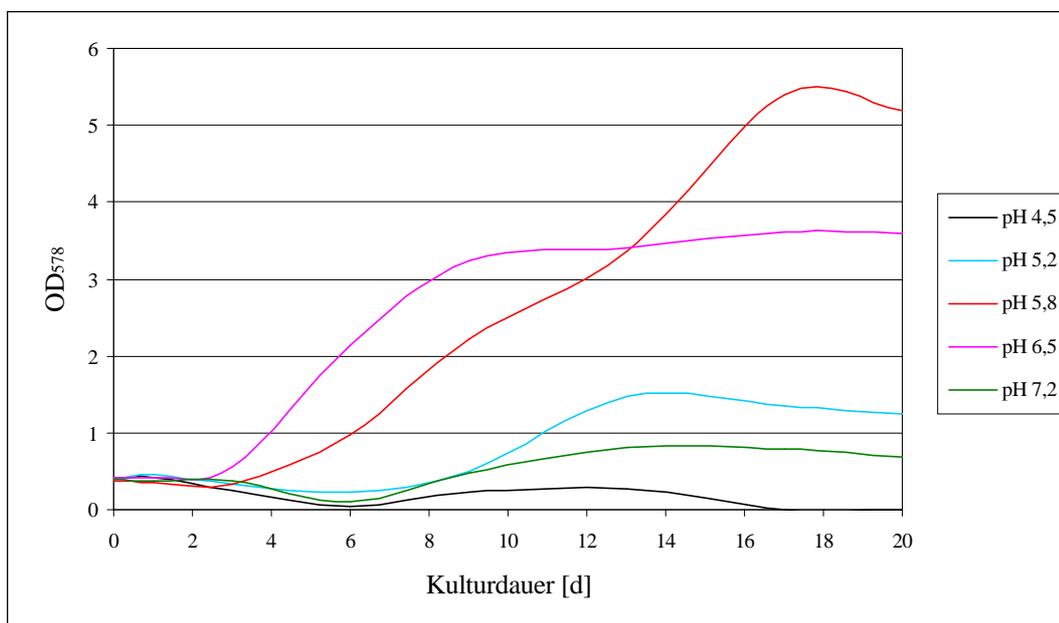


Abb. 4.6 Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>.

In der Kultur des pH-Wertes 5,8 wuchsen die Pflanzenzellen nach dreitägiger *lag*-Phase bis zum 17. Kultivierungstag auf eine OD<sub>578</sub> von 5,4 an. Dieser Wert, der einem FG von 456 g/l entsprach, war der höchste in allen fünf Ansätzen. In dem Ansatz mit dem pH 6,5 wurde am selben Tag, eine OD<sub>578</sub> von 3,62 (303 g/l FG) gemessen. Bei diesem pH-Wert war das Zellwachstum bereits deutlich reduziert. Dieser Effekt wurde bei den Kulturen des pH 5,2 (OD<sub>578</sub>: 1,48; FG: 118 g/l) und pH 7,2 (OD<sub>578</sub>: 0,82; FG: 61 g/l) noch deutlicher. Die Pflanzenzellen im Medium mit dem niedrigsten pH-Wert 4,8 wuchsen nicht und

mit zunehmender Kulturdauer sank die  $OD_{578}$  ab. Dieser Wert ließ auf den Zelltod und die Lyse der Zellen schließen.

#### 4.2.5 Saccharosekonzentration

Durch den Einsatz unterschiedlicher Saccharosekonzentrationen im  $MSHe_{(L)}$  Medium wurde die Substratabhängigkeit der Süßkartoffelzellen in Suspensionskulturen untersucht. Es wurden fünf Saccharosekonzentrationen in 100 ml Medium im 250 ml Erlenmeyerkolben eingestellt und der Verlauf des Zellwachstums über 20 Tage gemessen. Die  $OD_{578}$  diente als Meßparameter (2.4.3).

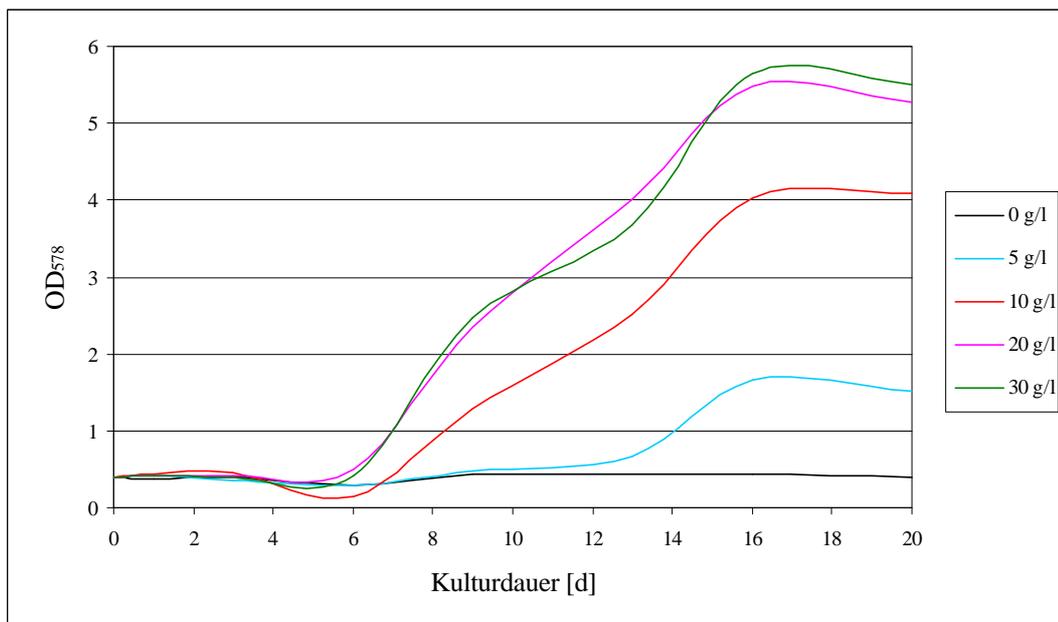


Abb. 4.7 Einfluß der Saccharosekonzentration im  $MSHe_{(L)}$  auf das Wachstum der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur.

Das Wachstum der Kulturen mit 30 und 20 g/l Saccharose verlief nahezu identisch, was darauf hindeutete, daß in beiden Ansätzen ein Überschuß an C-Quelle vorlag und das Wachstum der Pflanzenzellen nicht durch die C-Quelle limitiert wurde. Mit 10 g/l Saccharose im Medium nahm die  $OD_{578}$  langsamer zu und erreichte das Maximum der Kulturen mit höherer C-Konzentration nicht. Dies wies auf ein suboptimales Wachstum der suspendierten Zellen, als Folge auf eine

Limitation durch die C-Quelle hin. Dieses wurde durch den Wachstumsverlauf der Zellsuspension mit 5 g/l Saccharose bestätigt. Die  $OD_{578}$  stieg nur bis auf ein Drittel der Werte, der nicht limitierten Kulturen an. In dem Medium ohne Saccharose konnte kein Wachstum festgestellt werden.

Die limitierende Saccharosekonzentration wurde für die Interaktionsexperimente (4.3 und 4.4) verwendet.

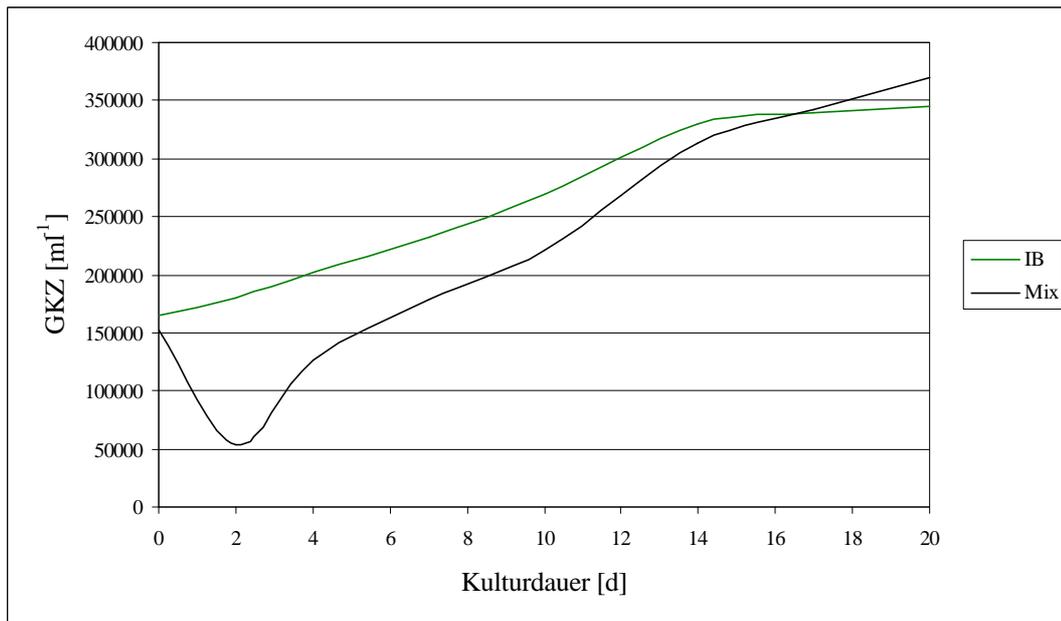
### **4.3 Interaktionsexperimente im statischen System**

Für die Untersuchungen bezüglich der Interaktionen der Süßkartoffelzellen *Ipomoea batatas* (L.) Lam und des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 wurden die Resultate der Experimente unter 4.2 berücksichtigt.

#### **4.3.1 Schüttelkulturen**

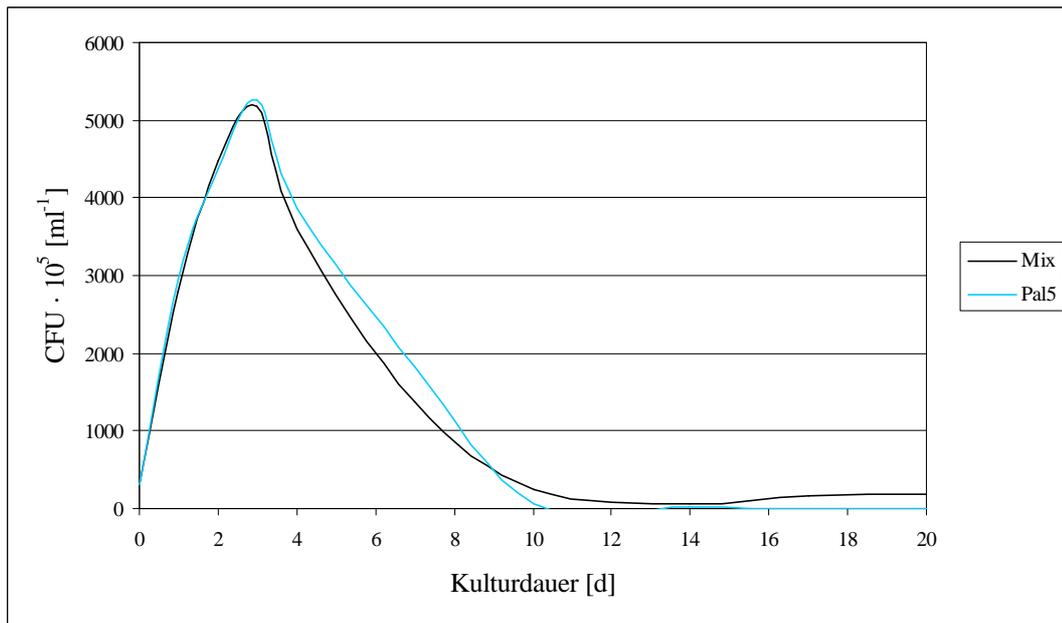
Für die Experimente in den Schüttelkulturen wurde  $MSHe_{(L)}$  mit 5 g/l Saccharose eingesetzt. Diese Konzentration der C-Quelle war limitierend für das Wachstum der Pflanzenzellen und der Bakterienkulturen.

Es wurden die Wachstumskinetiken der Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam und von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Reinkultur und in Mischkultur analysiert. Die Analysemethoden, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, waren die GKZ für die Pflanzenzellen (2.4.2) und die CFU für das Bakterienwachstum (2.4.5). Zusätzlich wurde die Saccharoseverwertung (2.5.8) in den Kulturen untersucht.



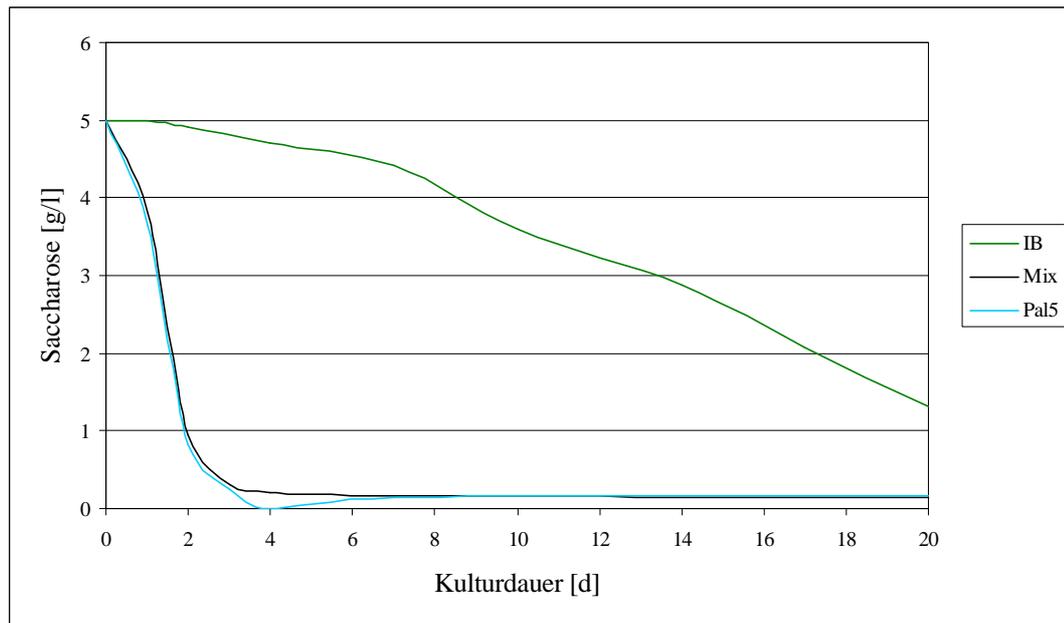
**Abb. 4.8** Vergleich des Wachstums von *Ipomoea batatas* (L.) Lam als Reinkultur (IB) und in Mischkultur (Mix) mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub> mit der limitierenden Kohlenstoffkonzentration

In der Mischkultur nahm die GKZ der Pflanzenzellen in den ersten zwei Tagen nach der Inokulation um über 50 % ab und stieg danach kontinuierlich an. Diese Abnahme zu Versuchsbeginn fand in der Reinkultur nicht statt, sondern hier begannen die Süßkartoffelzellen direkt nach der Inokulation zu wachsen. Am 14. Tag nahm die Wachstumsgeschwindigkeit ab und lief in einer stationären Phase aus. Die Mischkultur wuchs bis zum 20. Kultivierungstag, dem Ende des Experimentes und erreichte am 17. Tag die gleichen Zellzahlen wie die Reinkultur. In den letzten drei wurden Tagen wurden in der Mischkultur höhere GKZ ermittelt.



**Abb. 4.9** Vergleich des Wachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 als Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub> mit limitierender Kohlenstoffkonzentration

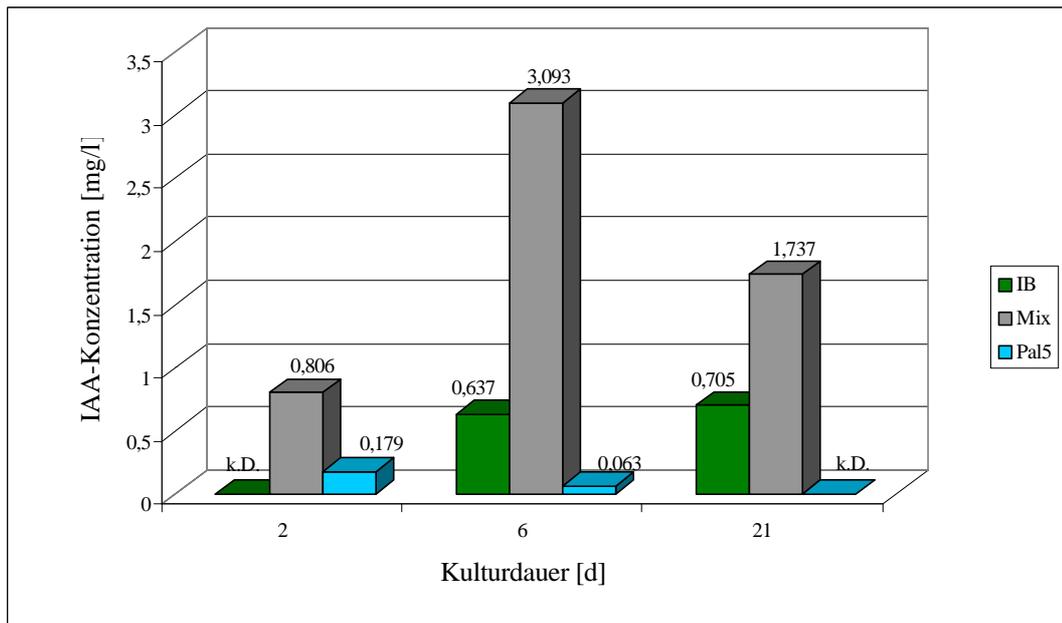
Die Analyse der CFU von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in der Rein- und in der Mischkultur zeigten, daß die Kinetiken in beiden Kulturen identisch waren. Erst am 15. Kulturtag traten Unterschiede auf, während in der Reinkultur die Zellzahl auf  $10^4$  Zellen pro ml sank, nahm die CFU der Bakterien in der Mischkultur zu diesem Zeitpunkt wieder zu und stabilisierte sich bei  $1,8 \cdot 10^7$  Zellen pro ml. Am 20. Kulturtag enthielt die Mischkultur ca. die 1000 Mal mehr vitale Bakterien pro ml Suspension, als zum gleichen Zeitpunkt aus der Mischkultur isoliert wurden.



**Abb. 4.10** Vergleich der Zuckerverwertung in den Reinkulturen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam (IB) und von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Pal5) mit der Mischkultur (Mix) in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>.

Die Zuckeranalyse belegte, daß die zweite Wachstumsphase des Endophyten nicht auf der Bereitstellung von Saccharose, Glucose oder Fructose beruhte, denn in der Mischkultur waren diese C-Quellen, ebenso wie in der bakteriellen Reinkultur, bereits nach dem dritten Tag aufgebraucht.

Neben der Zuckeranalyse wurde das Medium auch auf den Gehalt an IAA, einem natürlich vorkommenden Phytohormon, das auch von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 gebildet wird, untersucht. Die Konzentration der IAA in den Kulturmedien der Rein- und Mischkulturen wurde durch HPLC Analysen zu mehreren Zeitpunkten nach der Inokulation der Zellen bestimmt. Die Analyse erfolgte durch Standardaddition von 25 mg/l IAA zur Probe, um die Meßwerte in den linearen Bereich der Eichgeraden aufzukonzentrieren.



**Abb. 4.11** IAA-Konzentrationen in den Reinkulturen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam (IB) und von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Pal5) und in der Mischkultur (Mix) in Schüttelkultur auf MSHe<sub>(L)</sub>. (k.D. = keine Meßdaten)

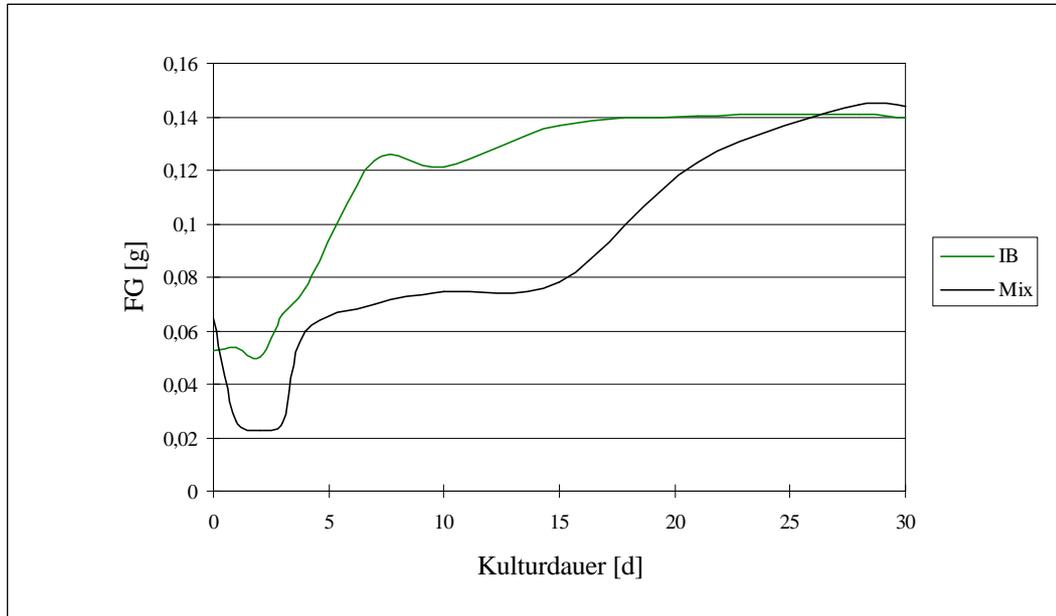
Die IAA Konzentration in den Medien der pflanzlichen Reinkultur war nach dem 6. und 21. Tag gleich hoch und schien sich im Verlaufe der Kulturdauer nicht zu verändern. In den bakteriellen Reinkulturen war die IAA-Konzentration geringer als bei den Pflanzenzellen. Am 2. Tag, dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase und dem Beginn der stationären Phase betrug der Gehalt der IAA im Medium 0,179 mg/l und nahm danach auf 0,063 mg/l ab. Die IAA-Konzentration in der Mischkultur lag stets über den Einzelwerten der Reinkulturen und betrug am 2. Tag 0,806 mg/l IAA. Dieser Wert entsprach etwa der Summe aus pflanzlicher und bakterieller Reinkultur des gleichen Tages. Bis zum 6. Tag stieg die IAA Konzentration in der Mischkultur auf 3,093 mg/l an, was mehr als dem vierfachen der Summe der korrespondierenden Reinkulturen entsprach. Mit zunehmender Inkubationsdauer (21. Tag) sank der IAA Gehalt in der Mischkultur dann wieder ab.

### 4.3.2 Röhrenexperimente

In den Röhrenexperimenten wurden kompakte Kallusstücke auf Teflonscheiben, die auf dem Medium schwimmend befestigt waren, ausgelegt. In das Medium, das sich im abgedunkelten Bereich der Kulturröhre befand, wurde *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 inokuliert. Unter diesen Bedingungen wurde die Interaktion bezüglich der C-Quelle und der N-Versorgung zwischen den Süßkartoffelzellen und dem diazotrophen Endophyten untersucht. Für den Kallus wurden die Bestimmungen des FG (2.4.1), für die Bakterien die Analysen der CFU (2.4.5) und der OD<sub>578</sub> (2.4.7) durchgeführt.

#### 4.3.2.1 Kultivierung auf saccharosefreiem Medium

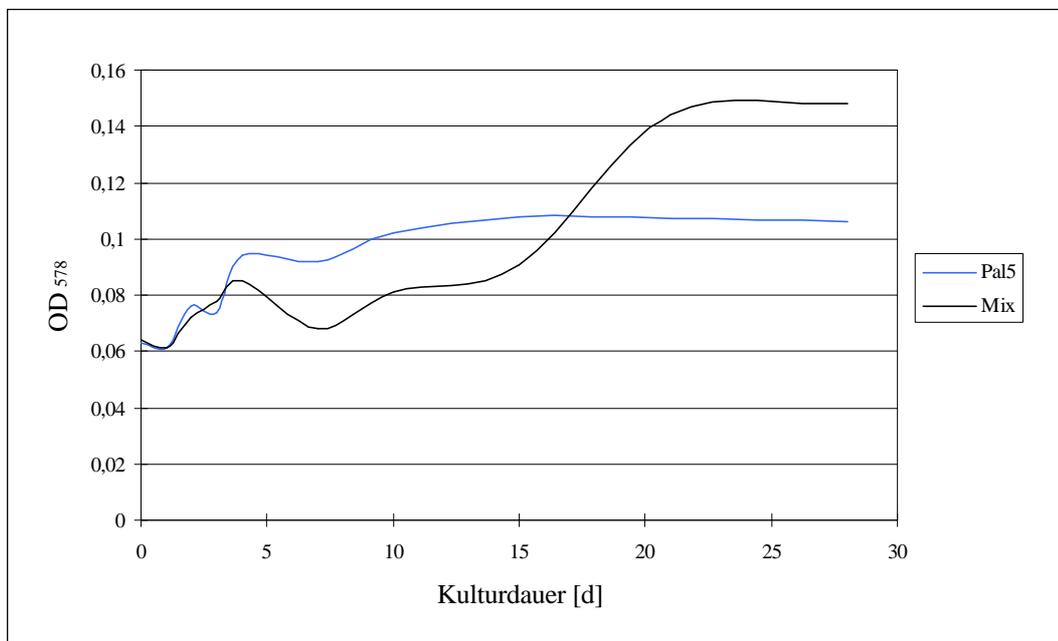
Es wurde MSHe<sub>(L)</sub> ohne Saccharose in den Kulturröhren vorgelegt und mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* angeimpft, so daß die Suspension eine OD<sub>578</sub> von 0,07 aufwies. Auf den Teflonscheiben wurden Kallusstücke von 0,6 g FG ausgelegt.



**Abb. 4.12** Vergleich des Kalluswachstums von *Ipomoea batatas* (L.) Lam als Reinkultur (IB) und in Mischkultur (Mix) mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne Saccharose

Der Kallus in Reinkultur begann nach drei Tagen meßbar zu wachsen. Das FG verdoppelte sich bis zum 7. Kulturtag und stabilisierte sich dann in einer stationäre Phase bei einem FG von 1,4 g. Das Wachstumsverhalten des Kallus in Mischkultur zeigte einen anderen Verlauf. Anfangs nahm das FG etwa um 50 % ab, bevor am 4. Kulturtag die erste Zunahme gemessen werden konnte. Ab diesem Tag nahm die Zellmasse kontinuierlich zu und erreichte am 28. Tag das gleiche FG wie der Kallus in der Reinkultur.

Unter den gleichen Bedingungen wurde das Wachstum von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in der Mischkultur untersucht und mit dem der Reinkultur auf saccharosefreiem MSHe<sub>(L)</sub> verglichen.

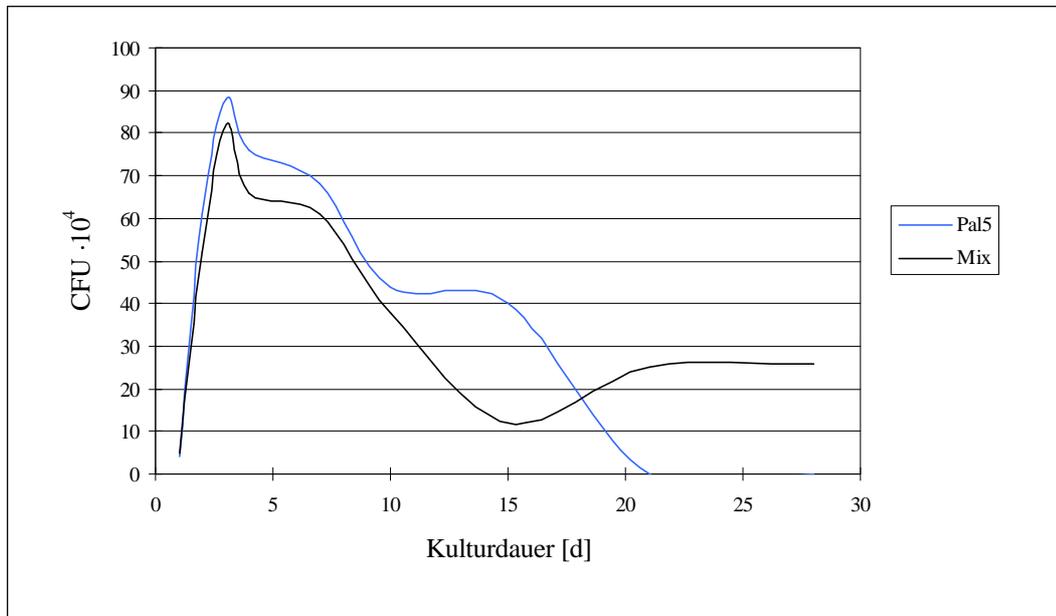


**Abb. 4.13** Vergleich des Zellwachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 als Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne Saccharose anhand der OD<sub>578</sub>.

Der Endophyt wuchs anfangs in Reinkultur mit höherer Teilungsrate als in der Mischkultur mit der Süßkartoffel. Ab dem vierten Tag befand sich die Reinkultur in der stationären Phase, die in diesem Medium bei einer OD<sub>578</sub> von 0,98-1,08 lag. In der Mischkultur wurde die stationäre Phase zeitgleich erreicht, doch die OD<sub>578</sub> lag in diesem Ansatz niedriger (0,8). Ab dem 15. Kulturtag fand dann eine zweite

Wachstumsphase in den Mischkulturen statt, die in einer  $OD_{578}$  von 1,48 resultierte und deutlich über der der Reinkultur lag.

Die Analyse der CFU von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 im Medium bestätigte diese zweite Wachstumsphase ab dem 15. Kulturtag.

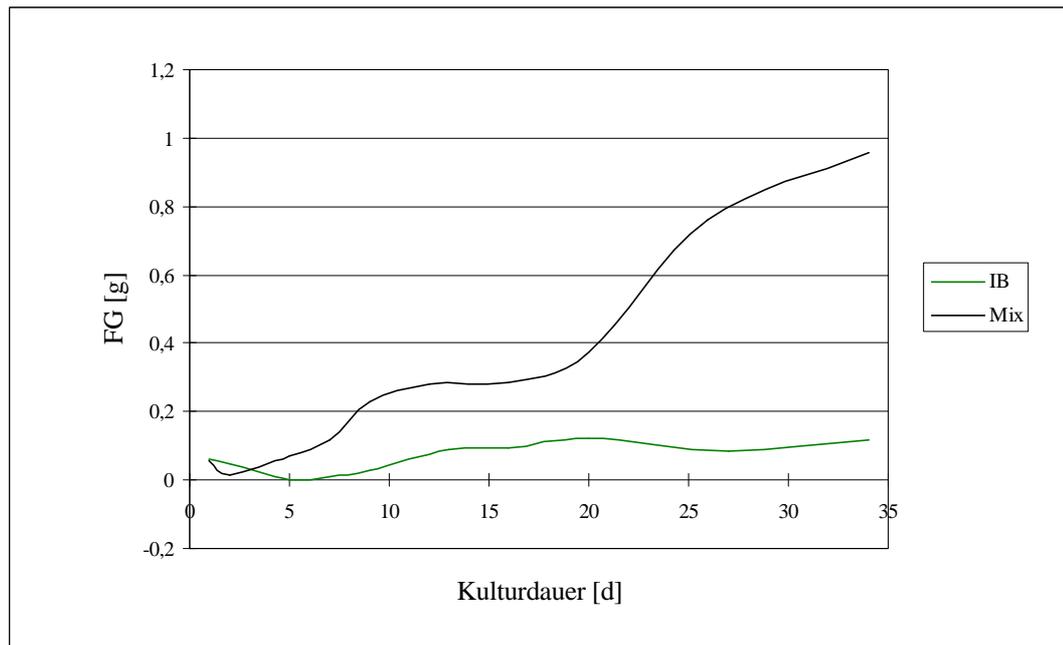


**Abb. 4.14** Vergleich des Zellwachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 als Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Kulturröhren auf  $MSHe_{(L)}$  ohne Saccharose anhand der CFU.

Beide Kulturen entwickelten sich ähnlich, mit einer Zunahme der CFU bis zum 4. Kulturtag und der darauf folgenden Abnahme der vitalen Zellen. Am 15. Kulturtag nahm die Lebendzellzahl der Bakterienzellen in der Mischkultur erneut zu, während die der Reinkultur weiter fiel.

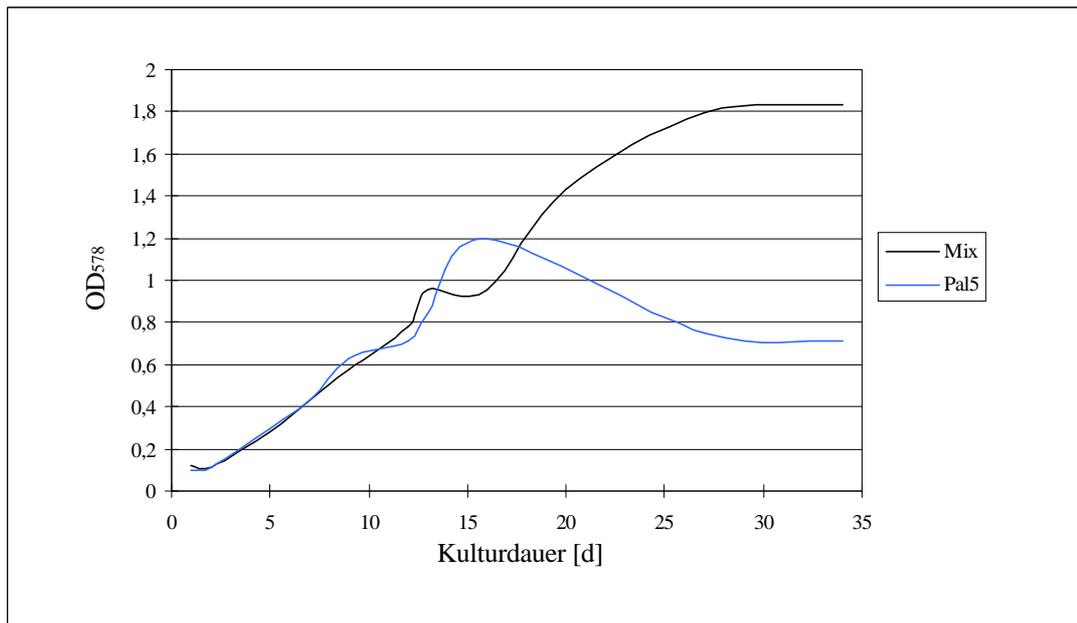
#### 4.3.2.2 Kultivierung auf stickstofffreiem Medium

Es wurde  $MSHe_{(L)}$  Medium ohne Zugabe der stickstoffhaltigen Makroelemente  $KNO_3$  und  $NH_4NO_3$  hergestellt. Dem Medium wurden 0,12 mM  $(NH_4)_2SO_4$  zugefügt, was in Vorversuchen als optimale Starterdosis für die Stickstofffixierung durch *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ermittelt wurde. Das Medium wurde mit diesem diazotrophen Endophyten auf eine  $OD_{578}$  von 0,1 angeimpft. Das FG des ausgelegte Kallus betrug 0,6 g pro Kulturröhre.



**Abb. 4.15** Vergleich des Kalluswachstums von *Ipomoea batatas* (L.) als Reinkultur (IB) und in Mischkultur (Mix) mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne gebundenen Stickstoff.

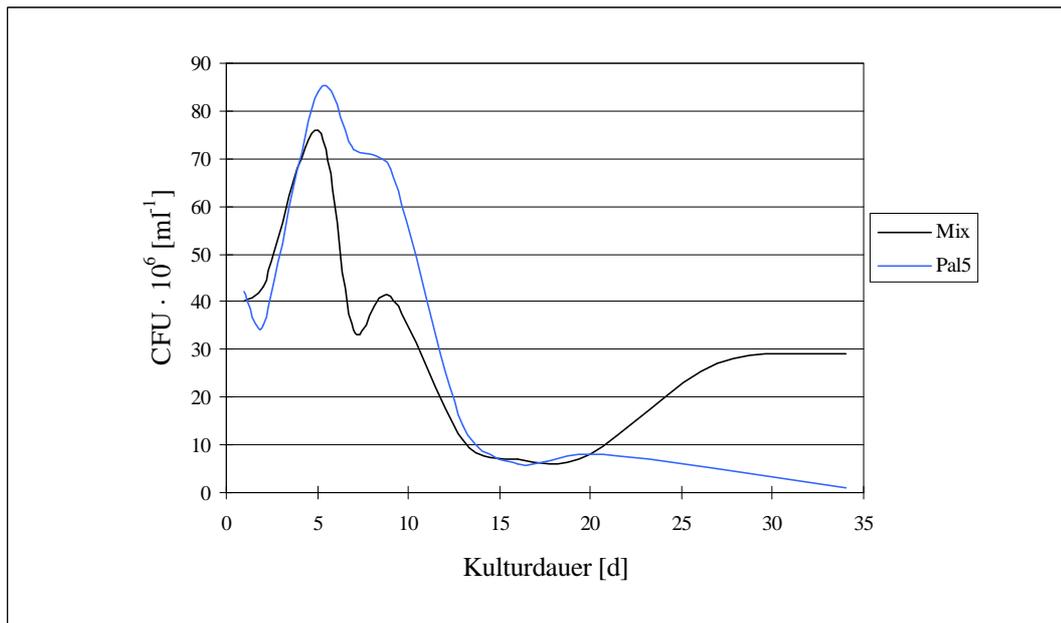
Der Kallus von *Ipomoea batatas* (L.) Lam zeigte sowohl in Reinkultur als auch in Mischkultur mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 bis zum 5. Kulturtag kein Wachstum. Dann nahm die Pflanzenzellmasse in der Röhre der Mischkultur zu und erreichte ein Maximalgewicht von 0,96 g. In der Reinkultur wurde ein maximales FG von 0,12 g gewogen.



**Abb. 4.16** Vergleich des Zellwachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 als Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne gebundenen Stickstoff anhand der OD<sub>578</sub>.

Die Messungen der OD<sub>578</sub> für das Wachstum von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ergaben, daß das Bakterium auf diesem Medium in Reinkultur und Mischkultur bis zum 13. Tag gleich wuchs. Dann hatte der Endophyt in der Reinkultur die stationäre Wachstumsphase (OD<sub>578</sub> von 1,2) erreicht, während die bakterielle Biomasse in der Mischkultur bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1,8 weiter anstieg.

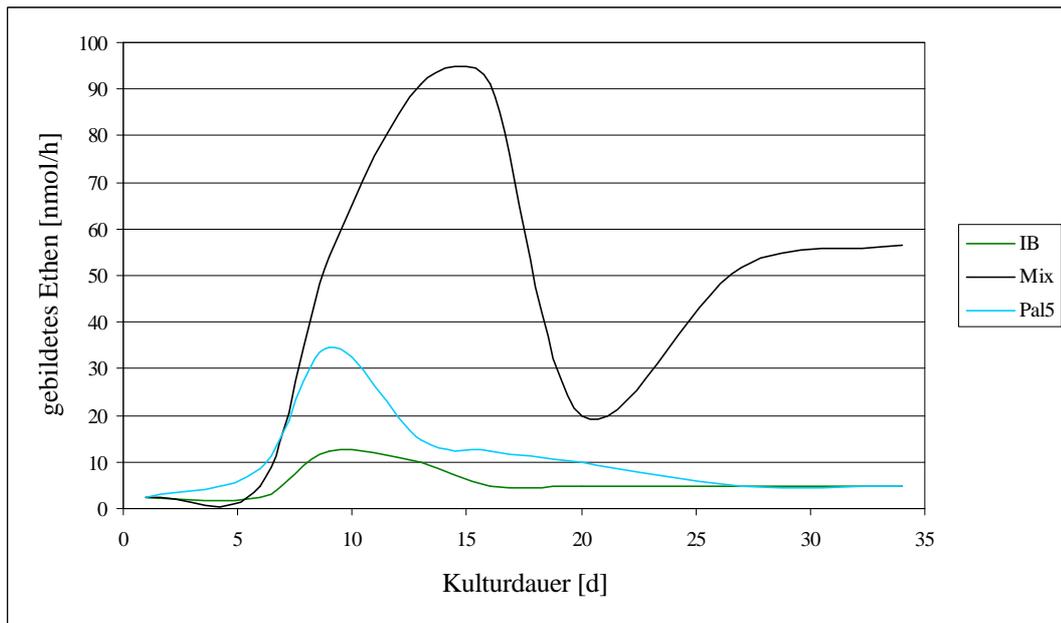
Wie schon bei dem Wachstum auf saccharosefreiem Medium (Abb. 4.12–Abb. 4.15) wurden die OD<sub>578</sub> Messungen auch auf dem stickstofffreien Medium von der Lebendzellzahlbestimmung bestätigt.



**Abb. 4.17** Vergleich des Zellwachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 als Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne Stickstoff anhand der CFU.

Auch auf diesem Medium nahmen in beiden Ansätzen die CFU nach kurzer *lag*-Phase zu und erreichten das Maximum nach fünf Kulturtagen. Danach sanken die Zahlen der vitalen Zellen in beiden Röhren wieder ab, doch während die für die Reinkultur kontinuierlich abnahm, stieg die Zahl der CFU in der Mischkultur ab dem 20. Kulturtag erneut an. Das gleiche Phänomen wurde auch schon auf dem saccharosefreien Medium (Abb. 4.14) beobachtet.

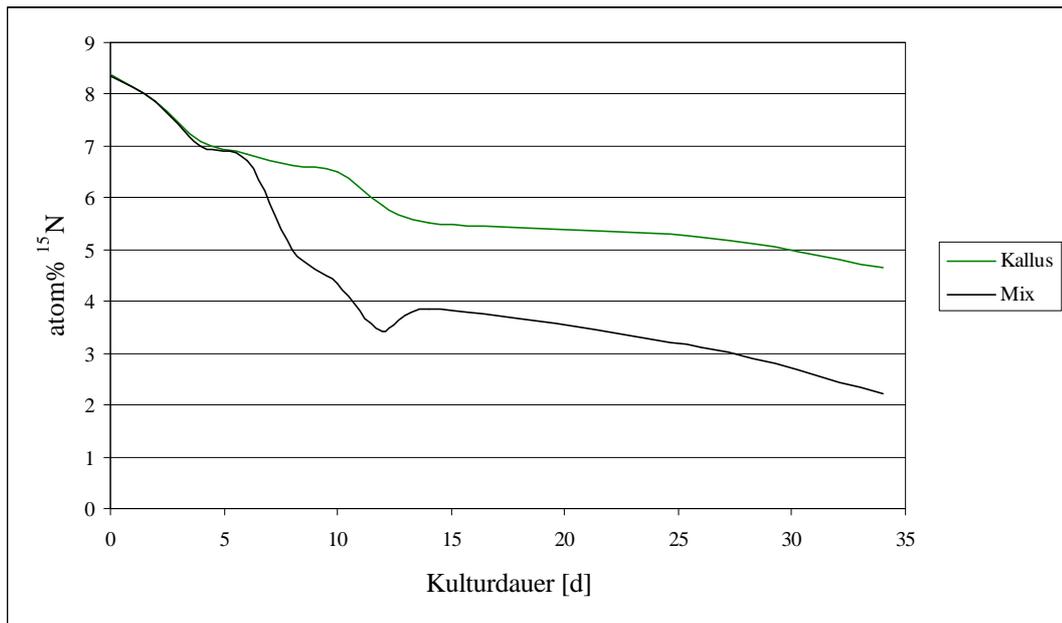
Anhand der ARA-Messungen (2.5.1), durch die die Nitrogenaseaktivität und somit die biologische Stickstofffixierung bestimmt wurde, konnte eine Kinetik aufgenommen werden, die mit den Bestimmungen der CFU korrelierte.



**Abb. 4.18** Ethenproduktion in den Reinkulturen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam (IB) und *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Pal5) und in der Mischkultur (Mix) in Kulturröhren auf MSHe<sub>(L)</sub> ohne Saccharose.

Die Ethylenproduktion nahm in den Reinkulturen der Süßkartoffel bis zum 10. Kulturtag etwas zu, denn Ethylen wird von Pflanzenzellen als Phytoeffektor gebildet. In den Reinkulturen von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 stieg die Ethylenkonzentration bis zum 9. Kulturtag an, was auf Nitrogenaseaktivität des diazotrophen Endophyten beruhte und fiel danach wieder auf den Startwert. In der Mischkultur stieg die Nitrogenaseaktivität bis zum 13. Kulturtag an und erreichte dabei signifikant höhere Umsetzungsraten, als die Reinkulturen. Dann sank auch in der Mischkultur die Nitrogenaseaktivität deutlich ab, um am 20. Kulturtag erneut anzusteigen.

Die Analysen der Isotopenverdünnungsmethode belegten, daß der positive Einfluß des diazotrophen Stickstofffixierers auf das Wachstum der Süßkartoffelzellen zum Teil auf der Fixierung und Bereitstellung von gebundenem Stickstoff beruhte. Der Anstieg der Nitrogenaseaktivität in den Mischkulturen am 20. Kulturtag fand zeitgleich mit der 2. Wachstumsphase von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Abb. 4.17) in Mischkultur statt.



**Abb. 4.19** Inkorporation von molekularem Luftstickstoff während des Kalluswachstums von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Reinkultur (IB) und in Mischkultur (Mix) mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf  $\text{MSHe}_{(L)}$  ohne gebundenen Stickstoff in Kulturröhren.

Während der exponentiellen Wachstumsphase des Bakteriums (bis zum 5. Tag) war der Gehalt des zuvor angereicherten Stickstoffisotops  $^{15}\text{N}$  in beiden Ansätzen gleich. Dann nahm der Anteil des Isotops  $^{15}\text{N}$  am Gesamtstickstoffgehalt in den Kalluszellen der Mischkultur stärker ab als in der Reinkultur, was auf eine höhere Verfügbarkeit von  $^{14}\text{N}$  durch die Bakterien hindeutete. Unter Berücksichtigung der Wachstumskurven der Kalli wurde deutlich, dass eine weitere Verdünnung des Isotops  $^{15}\text{N}$  in der Reinkultur ausblieb, weil die Zellen nicht weiter gewachsen sind, während der Kallus in der Mischkultur kontinuierlich wuchs und dadurch verstärkt  $^{14}\text{N}$  in die Zellmasse eingebaut hat.

#### 4.4 Interaktionsexperimente im Multiplen Chemostaten

Die Ergebnisse der Interaktionsexperimente resultieren aus parallel Versuchsansätzen von drei Kulturgefäßen, die zeitgleich im MC durchgeführt wurden. Es wurden jeweils eine Reinkultur der Pflanzenzellen, eine Reinkultur der Bakterien und eine Mischkultur aus beiden analysiert. Dadurch konnte das Inokulum für die Rein- und Mischkulturen aus der gleichen Vorkultur verwendet werden, wodurch die Vergleichbarkeit optimiert wurde. Zur besseren Darstellung der Resultate wurden die Ergebnisse dieser simultanen Läufe in mehrere Grafiken (Abb. 4.22 + 4.23; Abb. 4.24 + 4.25) aufgeteilt.

Im MC wurde das Wachstum der Zellsuspensionen unter definierten, geregelten Bedingungen in kontinuierlicher Kultur untersucht. Bestimmungsparameter für die Pflanzenzellen waren die  $OD_{578}$  (2.4.3), die Zahl vitaler Zellen (2.3.5) und die Proteinbestimmung (2.5.7). Für die Bakterien wurden die  $OD_{578}$  (2.4.7), die CFU (2.4.5) und das Proteingewicht (2.5.7) bestimmt. Die Berechnung der Wachstumsraten erfolgte nach der Formel von Jannasch (1969):

$$\mathbf{m}_{\max} = D + \frac{\ln c_1 - \ln c_2}{t_2 - t_1}$$

$\mu_{\max}$ : Maximale Wachstumsrate [ $\text{h}^{-1}$ ]

D: Verdünnungsrate bei Auswaschbedingungen [ $\text{h}^{-1}$ ]

$c_1$ : Biomasse oder  $OD_{578}$  zum Zeitpunkt  $t_1$

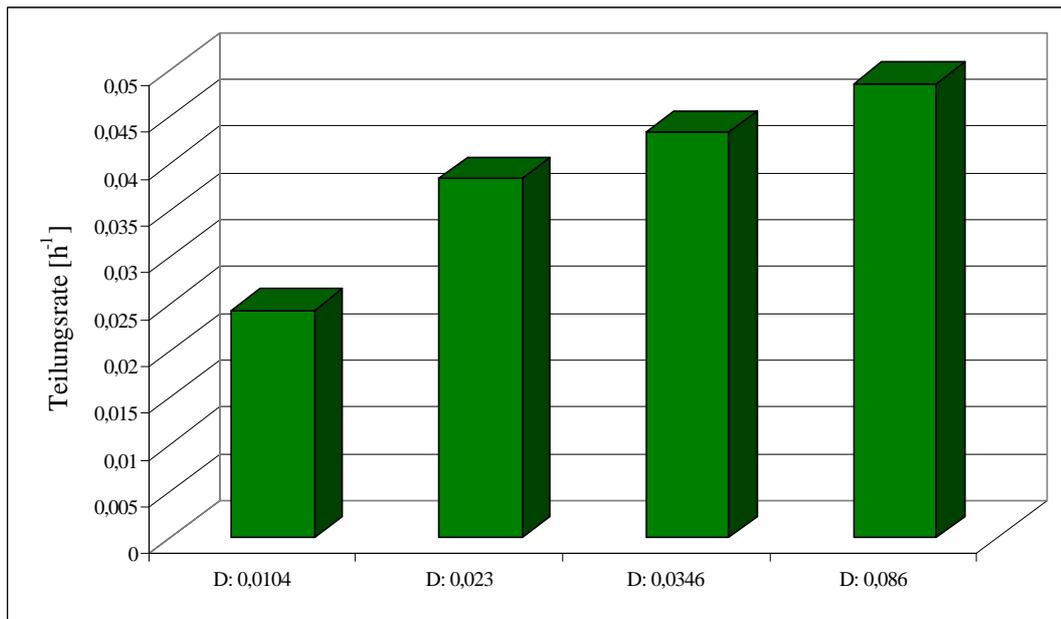
$c_2$ : Biomasse oder  $OD_{578}$  zum Zeitpunkt  $t_2$

$t_1$  und  $t_2$ : Zeitpunkte der Probenahmen

$$g_{\min} = \frac{1}{\mathbf{m}_{\max}}$$

$g_{\min}$ : Verdopplungszeit bei maximaler Wachstumsrate

Die erste Untersuchung im MC diente dazu, limitierende Wachstumsbedingungen für die Pflanzenzellen und Bakterien zu finden, um auf diese Weise die Möglichkeit für die Mischkulturen zu schaffen, mit gesteigertem Wachstum auf positive Einflüsse der Zellen aufeinander zu reagieren. Dafür mußte das Wachstum zuvor suboptimal, in diesem Fall durch Substratlimitation, gehalten werden.

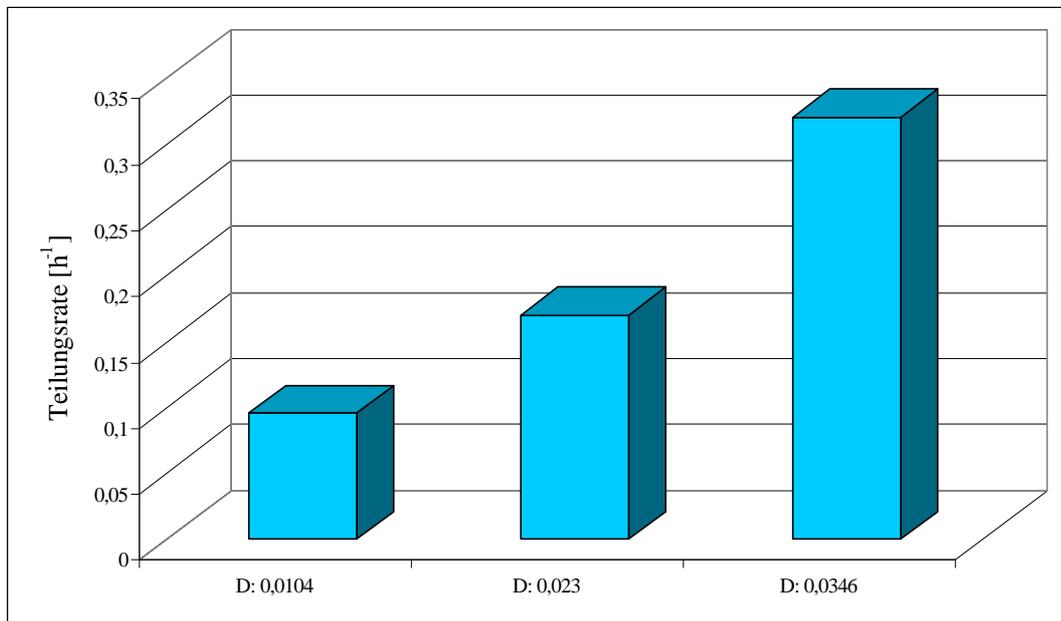


**Abb. 4.20** Wachstumsraten der Pflanzenzellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam bei vier verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten (D: 0,0104; D: 0,023; D: 0,0346; D: 0,086) in kontinuierlicher Kultur im MC. Die Konzentration der Saccharose in der Vorratsflasche betrug 5 g/l.

Das Wachstum der Süßkartoffelzellen war bei einer Durchflußrate von D: 0,0104 im MC über das Substrat limitiert. Diese Limitation wurde durch die Steigerung der Wachstumsrate der Pflanzenzellen bei Erhöhung der Durchflußrate belegt. Die Teilungsrate nahm zu, wenn frisches Medium ins Kulturgefäß gepumpt wurde, wodurch die verfügbare C-Quelle pro Zeiteinheit anstieg. Unter Auswaschbedingungen (Jannasch 1969) wurde dann die maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) der Süßkartoffelzellen bestimmt.

Diese  $\mu_{\max}$  betrug für suspendierte Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam auf dem MSHe<sub>(L)</sub> 0,0485 [h<sup>-1</sup>], was einer Generationszeit von 20,49 h entsprach.

Diese Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen für die Reinkulturen von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 durchgeführt.



**Abb. 4.21** Wachstumsraten von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 bei drei verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten (D: 0,0104; D: 0,023; D: 0,0346) in kontinuierlicher Kultur im MC. Die Konzentration der Saccharose in der Vorratsflasche betrug 5 g/l.

Die Abnahme der Teilungsrate von  $0,32 \text{ h}^{-1}$  bei einer Durchflußrate D: 0,0346 auf  $0,096 \text{ h}^{-1}$  bei D: 0,0104 belegte die Limitation des Wachstums von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 durch das Substrat bei der geringeren Fließgeschwindigkeit. Für den diazotrophen Endophyten wurde  $\mu_{\max}$  unter Auswaschbedingungen (Jannasch 1969) auf  $\text{MSHe}_{(\text{L})}$  und auf stickstoffreiem  $\text{MSHe}_{(\text{L})}$ -Medium mit einer Starterdosis von  $0,12 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  untersucht und kalkuliert. Die maximale Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) betrug auf diesem Medium und unter den gewählten Bedingungen  $0,32 \text{ h}^{-1}$ , was einer Verdopplungszeit von  $g_{\min} = 3,13 \text{ h}$  entsprach.

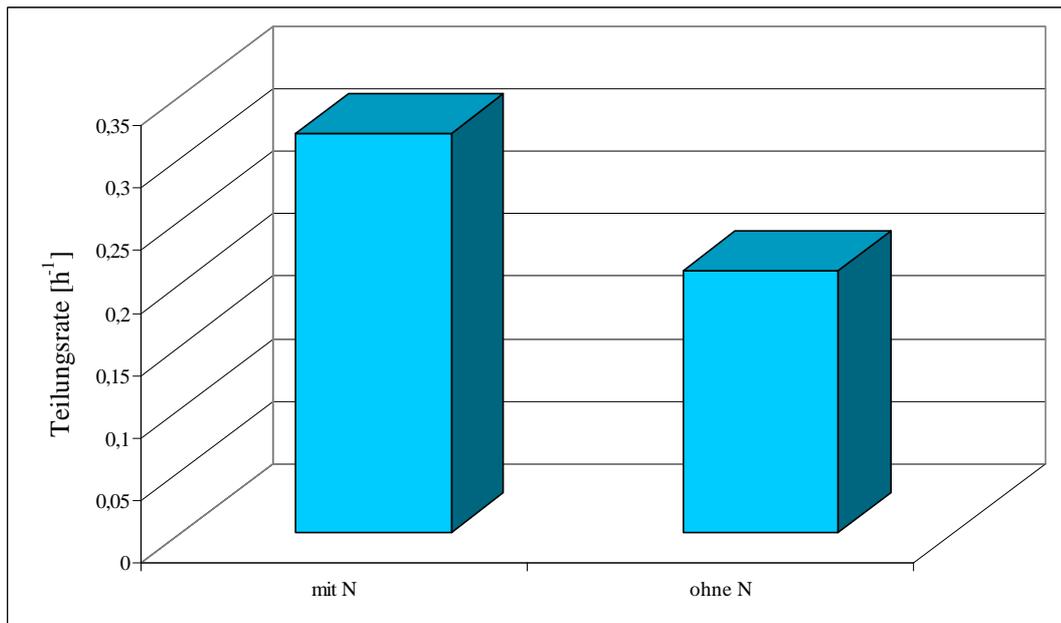


Abb. 4.22 Maximale Wachstumsrate *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in MSHe<sub>(L)</sub> mit 5 g/l Saccharose im MC (D: 0,103).

Unter Fixierungsbedingungen teilten sich die Bakterien langsamer ( $g_{\min} = 4,77$  h).

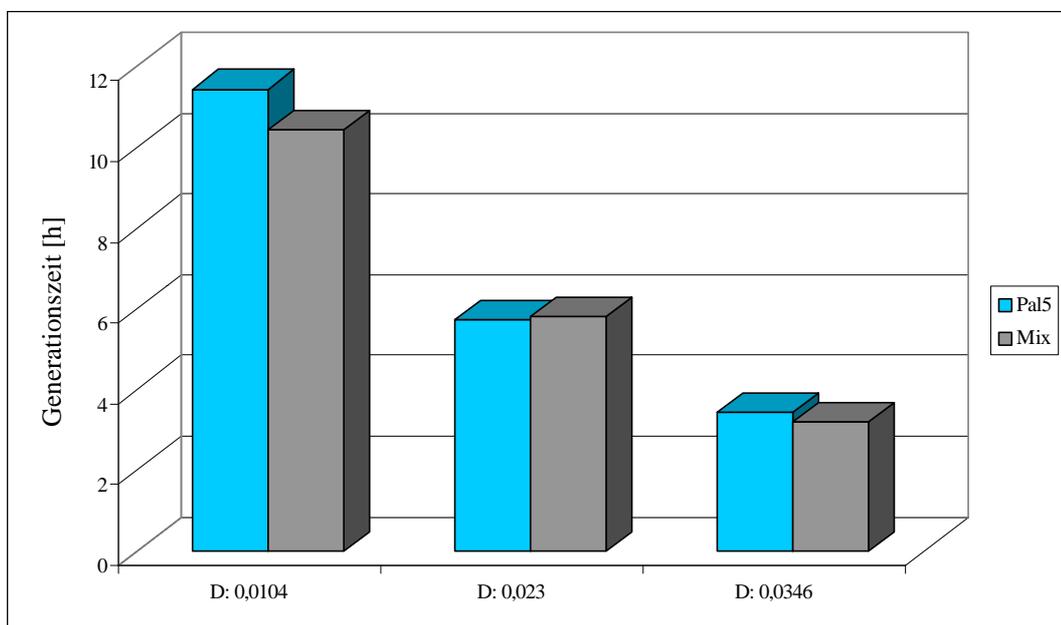
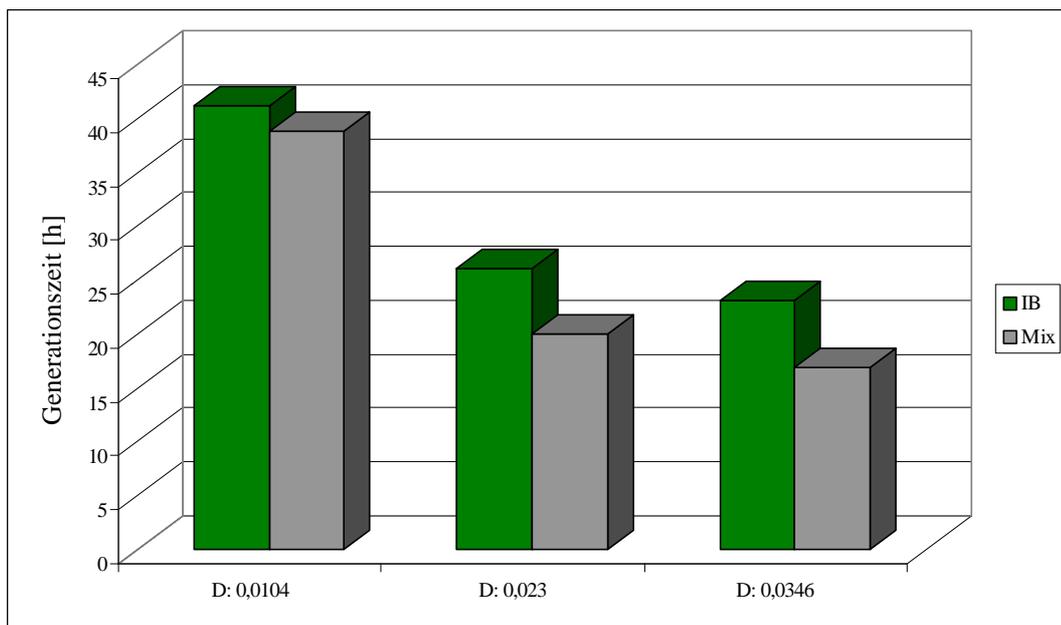


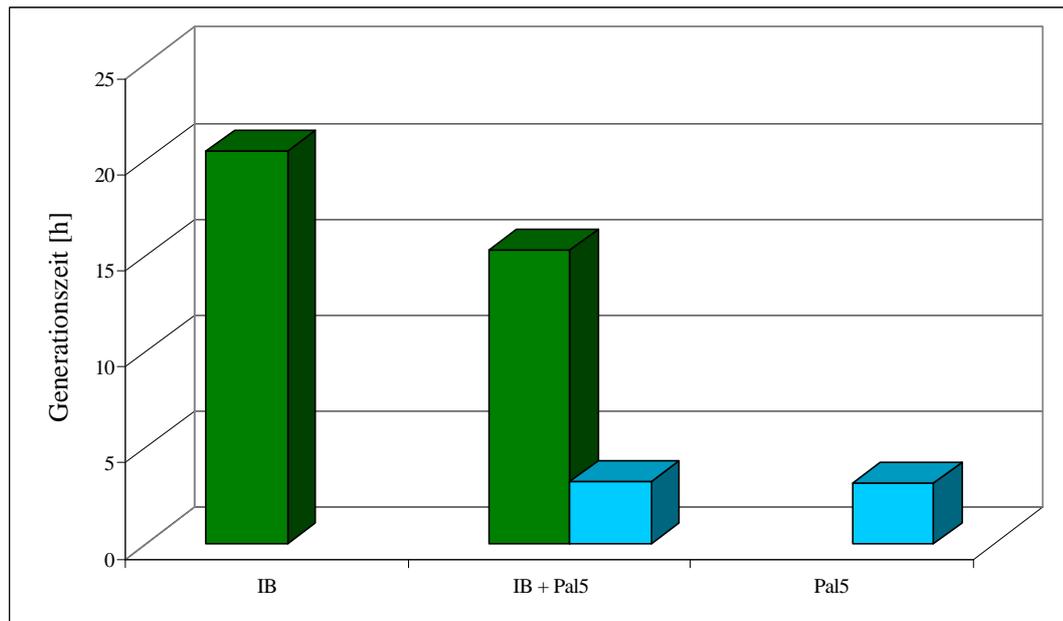
Abb. 4.23 Generationszeiten von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in Reinkultur (Pal5) und in Mischkultur (Mix) mit *Ipomoea batatas* (L.) Lam in MSHe<sub>(L)</sub> (5 g/l Saccharose) bei verschiedenen Durchflußraten (D: 0,0104; D: 0,023; D: 0,0346).

Das Wachstumsverhalten von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in der Mischkultur unterschied sich nicht von dem in Reinkultur. Die Generationszeiten des Endophyten wurden unter kontinuierlichen Bedingungen durch die Präsenz der Pflanzenzellen nicht beeinflusst. Die signifikant längeren Generationszeiten bei einer Durchflußrate  $D: 0,0104$  im Vergleich zu den Ansätzen mit höherer Durchflußrate belegten, daß in beiden Kulturen limitierende Bedingungen für das Bakterienwachstum herrschten.



**Abb. 4.24** Generationszeiten von *Ipomoea batatas* (L.) Lam in Reinkultur (IB) und in Mischkultur (Mix) mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in MSHe<sub>(L)</sub> (5 g/l Saccharose) bei verschiedenen Durchflußraten (D: 0,0104; D: 0,023; D: 0,0346).

Die Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam wurden durch die Gegenwart der Bakterien in der Mischkultur stimuliert und die Generationszeiten nahmen im Vergleich zur korrespondierenden Reinkulturen ab, d.h. sie teilten sich schneller. Diese Tendenz wurde bei allen drei unterschiedlichen Durchflußraten deutlich. Bestätigt wurde dieser Einfluß durch den Vergleich von  $\mu_{\max}$  der Pflanzenzellen in der Rein- und in der Mischkultur. Anstatt alle 20,49 h verdoppelten sich die Süßkartoffelzellen in Gegenwart von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 alle 15,27 h, was einer 25,48 %igen Steigerung der Wachstumsrate in bezug auf die Reinkulturen entsprach.



**Abb. 4.25** Minimale Generationszeiten der Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam (IB) und *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (Pal5) in Reinkultur und in gemeinsamer Mischkultur (IB + Pal5) in  $MSHe_{(L)}$  mit 5 g/l Saccharose im MC (D: 0,103).

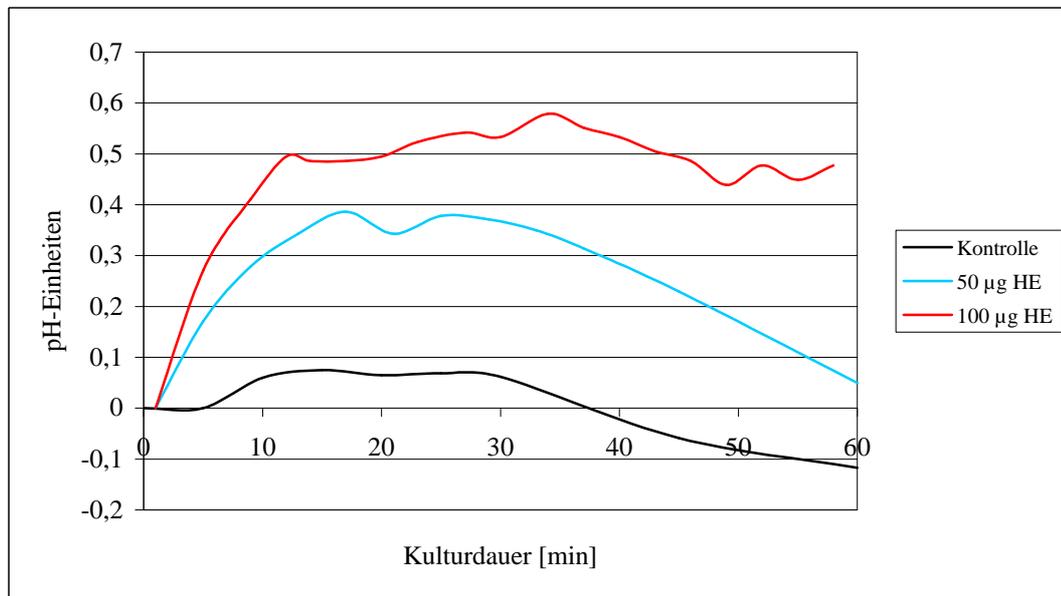
## 4.5 Pathogenantwort

Für die Messungen der Phytopathogenantwort von *Ipomoea batatas* (L.) Lam auf elicitorische Substanzen stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, mit denen die Änderungen der Membranpotentiale der Pflanzenzellen und die  $H_2O_2$  Produktion gemessen werden können. Beide Reaktionen gehören zu den frühen, schnellen Pathogenantworten (Kombrink and Somssich 1995).

### 4.5.1 Alkalisierungstest

Der Alkalisierungstest stellte eine einfache und schnelle Methode dar, um die Responsivität der suspendierten Süßkartoffelzellen auf den isolierten HE (2.3.9) zu untersuchen. Die Alkalisierung des Außenmediums gehört ebenso, wie die  $H_2O_2$  Entwicklung zu den schnellen Phytopathogenantworten, die durch Zugabe eines Elicitors induziert werden kann.

Mit diesem Meßaufbau wurde lediglich die Funktionalität des HE als Induktor einer Pathogenantwort in Süßkartoffelzellsuspensionen getestet. Dazu wurden Änderungen der pH-Werte nach Zugabe von 50 und 100 µg HE in 15 ml Zellsuspension im Vergleich zur Kontrolle gemessen.



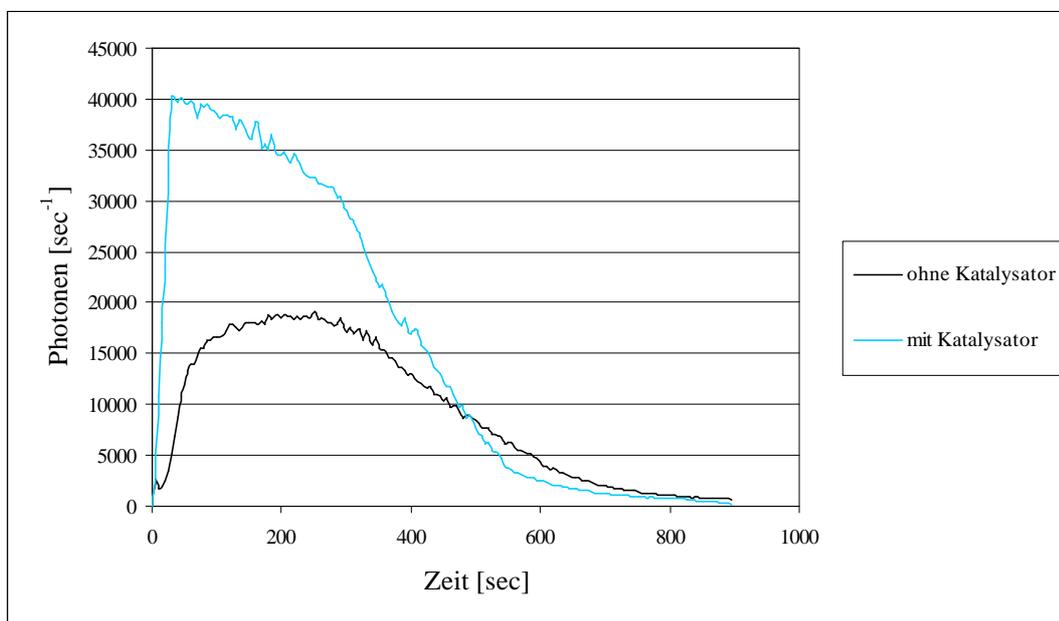
**Abb. 4.26** Einfluß des HE auf die Alkalisierung des Außenmediums in Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Die pH-Messungen ergaben für die Suspensionen, denen HE zugegeben worden war, daß das Medium stärker alkalisiert wurde, als das der Kontrollkultur ohne Elicitor. Bei der Kontrolle änderte sich der pH Wert innerhalb von 60 min lediglich um  $\pm 0,1$  pH-Einheiten, während die Alkalisierung bei einer Zugabe von 50 µg HE bereits 0,4 pH-Einheiten betrug. Die Verdopplung der Elicitorgabe von 50 auf 100 µg erhöhte die Alkalisierung weiter und betrug als Maximum 0,6 pH-Einheiten. Eine mögliche Steigerung der Intensität der Phytopathogenantwort durch höhere Dosen von HE wurden mit diesem Testsystem nicht durchgeführt, sondern mit der exakteren Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Methode (4.5.2) im Luminometer untersucht. Der Alkalisierungstest belegte, daß der HE als Elicitor zur Induktion einer Pathogenantwort in Süßkartoffelzellsuspensionen geeignet war.

#### 4.5.2 Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Test

Durch die Lumineszenzmessung war es möglich, eine der schnellen Pathogenantworten der Pflanze, die  $H_2O_2$  Entwicklung über ein Testsystem zu quantifizieren. Durch Zugabe des Katalysators Kaliumhexacyanoferrat und Luminol wurde das entstehende  $H_2O_2$  in emittierte Photonen umgewandelt, die im Luminometer gemessen werden konnten (2.6.2).

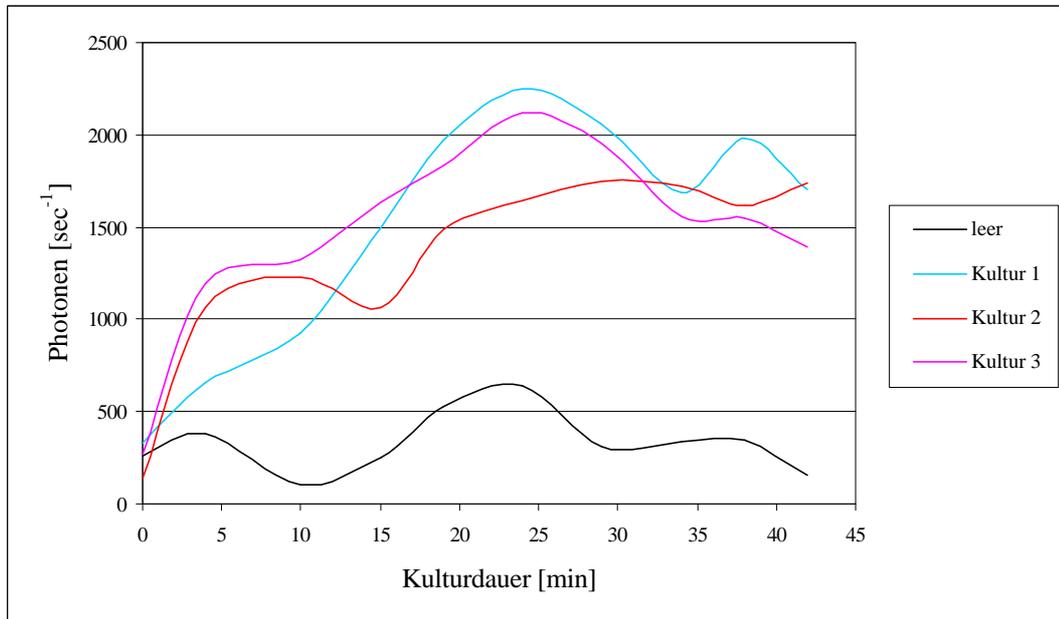
Es wurde die Kinetik einer Einzelmessung aufgenommen, durch die der optimale Meßbereich für diese Apparatur festgelegt werden konnte.



**Abb. 4.27** Verlauf einer Einzelmessung der  $H_2O_2$ -abhängigen Photonemission als Resultat einer Phytopathogenantwort in Suspensionskulturen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch HE (400  $\mu$ g/8 ml Zellsuspension).

Die Einzelmessung zeigte einen starken Anstieg der Photonemission, die nach 45 sec ein Maximum erreichte und danach langsam wieder gegen Null sank. Diese Messung belegte, daß die maximale Photonemission unter den gewählten Bedingungen innerhalb der ersten Minute erreicht wurde. In dieser Zeitspanne wurde bei den weiteren Experimenten gemessen.

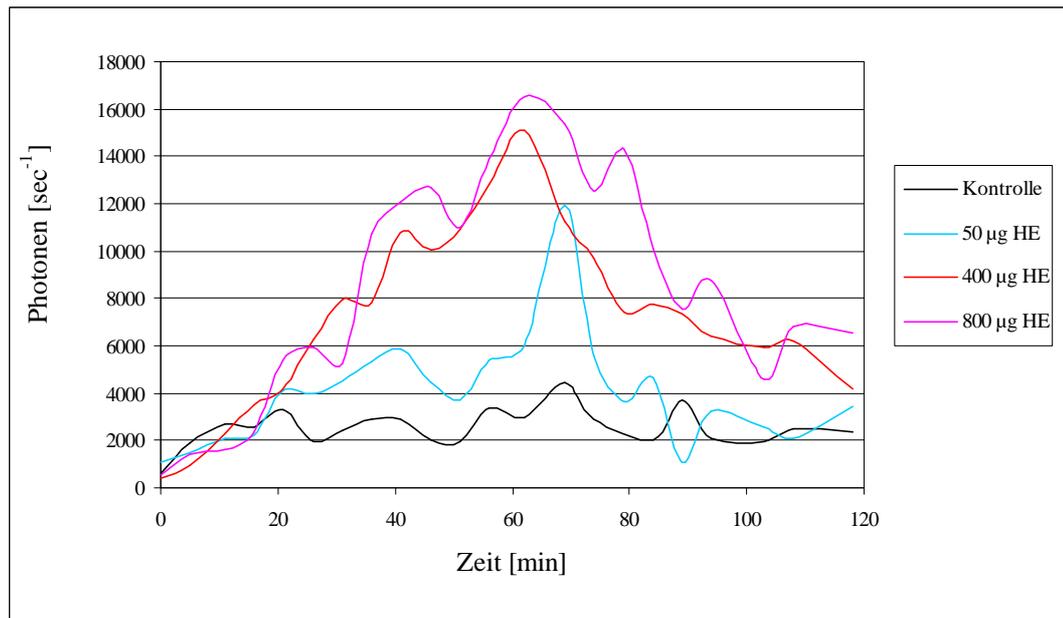
Als erstes wurde eine Verifikation der Ergebnisse der Alkalisierungsmessung durchgeführt, die die Wirksamkeit des HE für die Induktion einer Phytopathogenantwort bei den Süßkartoffelzellen festgestellt hatte.



**Abb. 4.28** Untersuchung der Eignung des HE zur Induktion einer Phytopathogenantwort in Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Die Experimente bestätigten die Wirksamkeit des HE auf die Süßkartoffelzellen. In alle Kulturen, denen HE appliziert wurde, fand eine signifikant höhere  $H_2O_2$  Entwicklung statt, als in den korrespondierenden Kontrollen ohne HE.

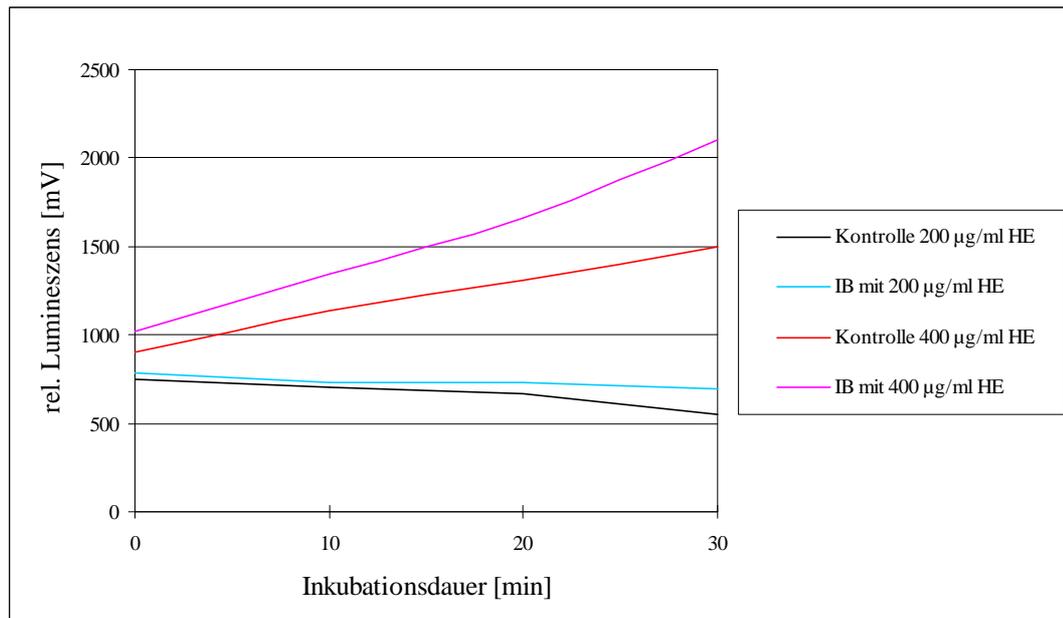
Der Einfluß der HE Konzentration auf die Intensität der Phytopathogenantwort wurde im folgenden untersucht. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen HE eingesetzt (50, 400, 800  $\mu\text{g}/8$  ml Suspension).



**Abb. 4.29** Einfluß der HE-Konzentration auf die Intensität der Phytopathogenantwort der Zellkulturen von *Ipomoea batatas* (L) Lam. unter Verwendung der Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Methode.

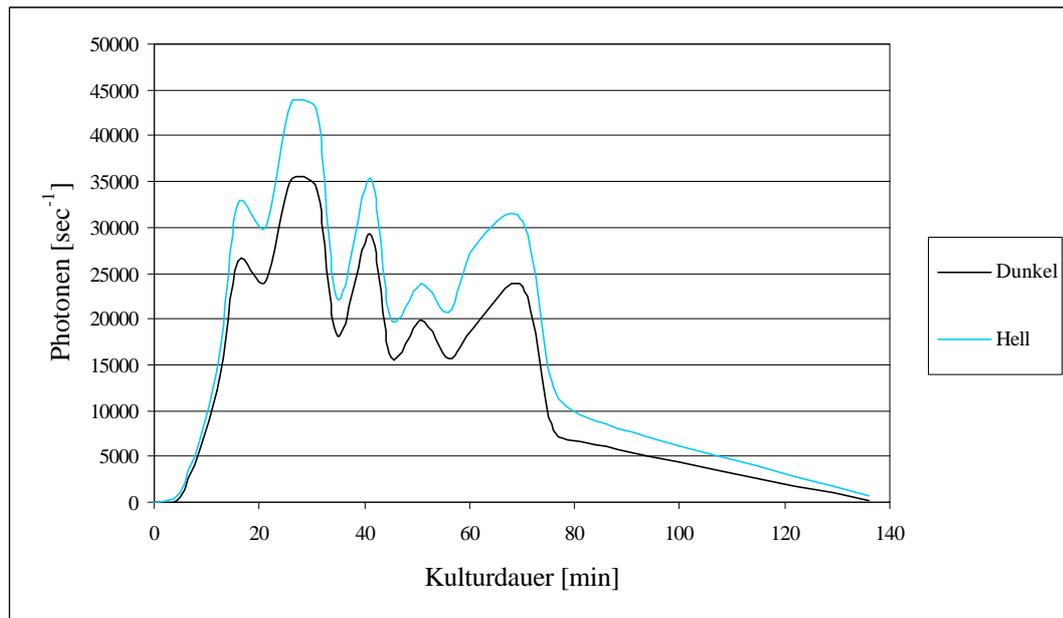
Es wurde eine Zunahme der Intensität der Pathogenantwort bei der Konzentrationserhöhung von 50 auf 400 µg HE festgestellt. Die Verdopplung der HE-Menge von 400 auf 800 µg erbrachte keine weitere Steigerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion in der Kultur, so daß 400 µg/8 ml Suspension als optimale Elicitorkonzentration definiert wurde.

Diese Ergebnisse wurden durch eine alternative Meßmethode für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Entwicklung, den QuantaBlue Test bestätigt. In diesem Testsystem induzierten 400 µg HE/8 ml Zellsuspension eine Pathogenantwort der Pflanzenzellen, die halbe Dosis reichte hierfür noch nicht aus.



**Abb. 4.30** Einfluß der HE-Konzentration auf die Intensität der Phytopathogenantwort der Zellkulturen von *Ipomoea batatas* (L) Lam. unter Verwendung des QuantaBlue Testes.

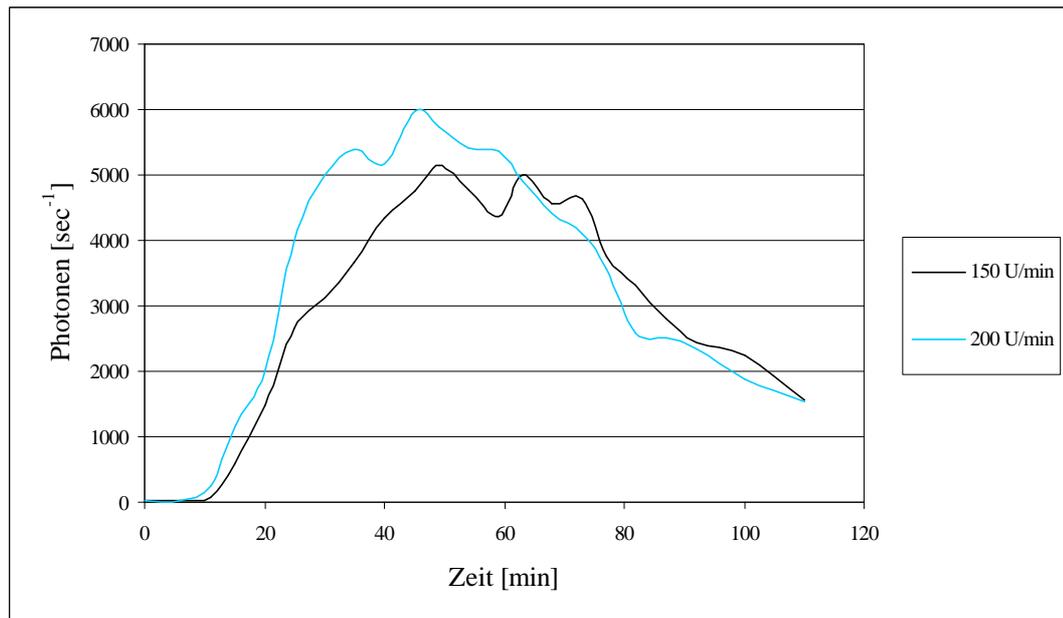
Danach erfolgte die Optimierung der Kulturbedingungen für die Pflanzenzellen, um die Phytopathogenantwort zu maximieren. Zuerst wurde der Einfluß der Belichtung der Pflanzenzellen in der Vorkultur auf die Pathogenantwort untersucht. Es wurden Pflanzensuspensionen, die im Tag-/Nachtrhythmus bei einer 16 h Belichtungsphase und einer 8 h Dunkelphase kultiviert wurden, mit Zellsuspensionen verglichen, die konsequent im Dunklen inkubiert wurden.



**Abb. 4.31** Einfluß des Tag-/Nachtrhythmuses auf die Responsivität der Pflanzensuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch 400 µg HE/8 ml Zellsuspension.

Die Kulturen, die im Tag-/Nachtrhythmus inkubiert worden waren, zeigten eine intensivere Pathogenantwort, als die Parallelen, die im Dunklen kultiviert worden waren. Beide Messungen verliefen parallel, wobei die der Tag-/Nachtkulturen oberhalb der Kulturen aus dem Dunklen verlief. Im weiteren wurden die Suspensionen, die für die Untersuchung der Pathogenantwort eingesetzt wurden, im Tag-/Nachtrhythmus inkubiert.

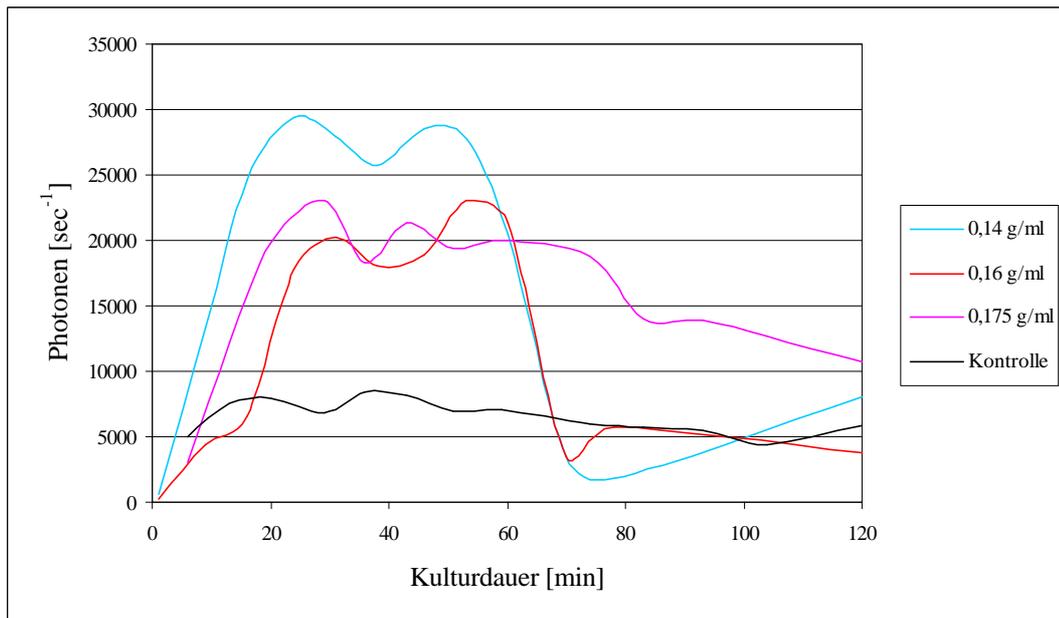
Als nächstes wurde der Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit untersucht. Es wurden Parallelen bei 150 und 200 U/min inkubiert.



**Abb. 4.32 Einfluß der Schüttelgeschwindigkeit auf die Responsivität der Pflanzenzellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch 400 µg HE/8 ml Zellsuspension.**

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Entwicklung war bei den Kulturen mit höherer Schüttelgeschwindigkeit in der Anfangsphase stärker als bei den Kulturen, die mit 150 U/min geschüttelt wurden. Ab der 62. min lag die Photonemission in den langsamer geschüttelten Kulturen über denen in den Ansätzen, die mit 200 U/min geschüttelt wurden. Weitere Erhöhungen der Schüttlergeschwindigkeit bewirkten keine Steigerung der Pathogenantwort. Im folgenden wurden Schüttelgeschwindigkeiten von 200 U/min eingesetzt.

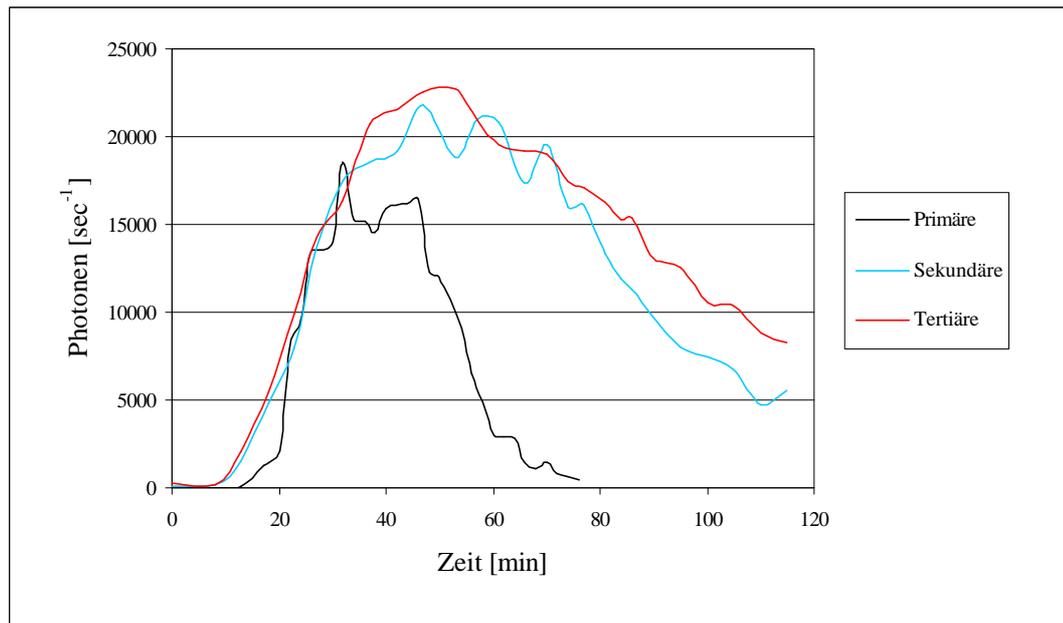
Die Analyse der optimalen Zelldichte wurde mit drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt (0,6, 0,14 und 0,175 g FG/8 ml Suspension).



**Abb. 4.33** Einfluß der Zelldichte auf die Responsivität der Pflanzensuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch 400 µg HE/8 ml Zellsuspension.

Die optimale Zelldichte für die Elicitation einer maximalen Pathogenantwort lag bei einem FG von 0,14 mg/8 ml Medium. Die Suspensionen mit einer niedrigeren oder höheren Zelldichte entwickelten eine geringere Pathogenantwort.

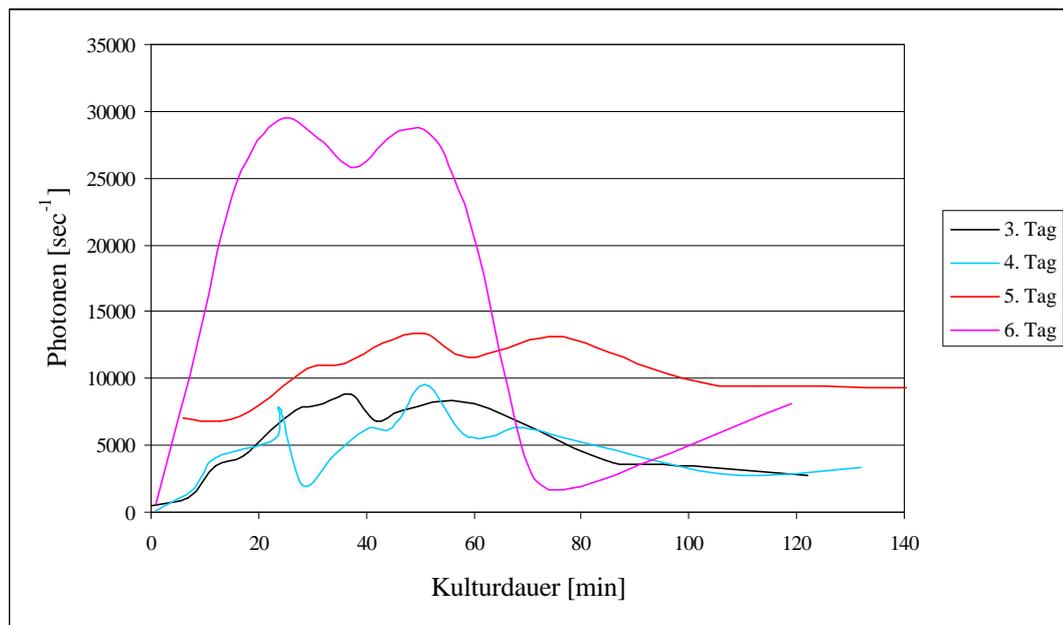
Ein weiterer zu untersuchender Parameter war der Status der Zellkulturen, die für die Lumineszenzmessung eingesetzt werden sollten. Die erste Untersuchung bezüglich dieses Status betraf den Etablierungsgrad der Suspension. Es wurden Suspensionen miteinander verglichen, die entweder frisch von der Platte in Suspension überführt worden waren (primäre Suspension), die bereits ein Mal von Flüssigmedium auf Flüssigmedium passagiert worden waren (sekundäre Suspension), oder die bereits die dritte Kulturperiode in Suspension inkubiert wurden (tertiäre Suspension).



**Abb. 4.34** Einfluß des Etablierungsgrades einer Pflanzensuspension auf die Intensität der Phytopathogenantwort von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch 400 µg HE/8 ml Zellsuspension. Primär: 1. Kulturperiode in Suspension (6. Tag nach der letzten Passage); Sekundär: 2. Kulturperiode in Suspension (4. Tag); Tertiär: 3. Kulturperiode in Suspension (4. Tag)

In der primären Suspension, die nach dem 6. Kulturtag, dem Tag der höchsten Pathogenantwort einer primären Pflanzensuspension der Süßkartoffel (nicht gezeigte Grafik), gemessen wurde, war die maximale Photonemission geringer als in den beiden etablierten Suspensionen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der sekundären und tertiären Suspension konnte nicht gemessen werden.

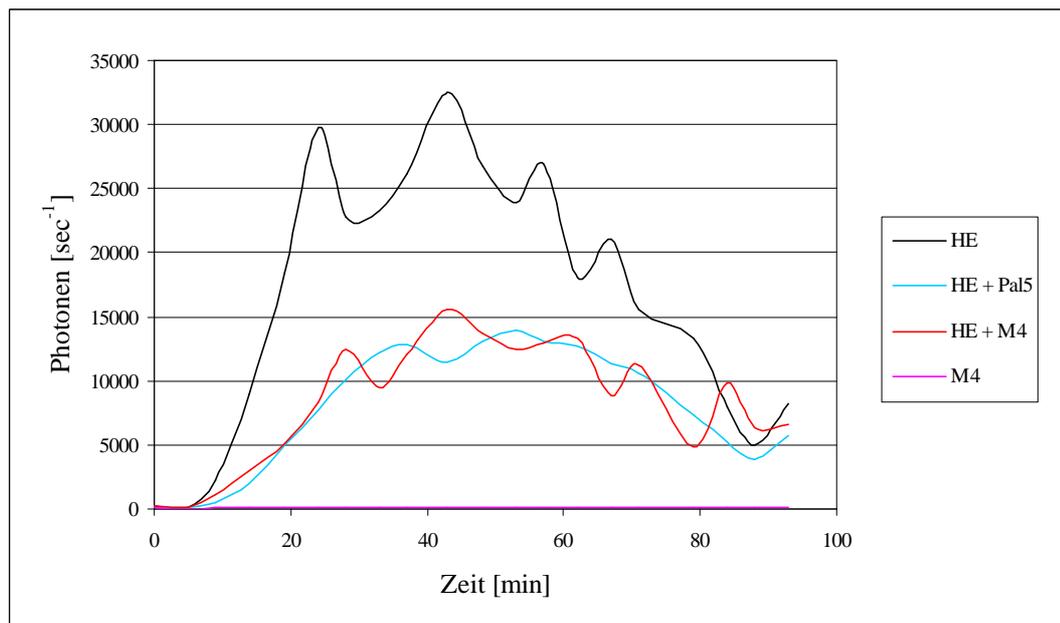
Die letzte Optimierung betraf das Kulturalter einer Zellsuspension nach der letzten Passage auf frisches MSHe<sub>(L)</sub>. Für diese Experimente wurden sekundäre Kulturen (s.o.) verwendet, die 3 – 6 Tage zuvor auf frisches Medium passagiert worden waren.



**Abb. 4.35** Untersuchung der optimalen Kulturdauer (nach der letzten Passage) auf frischem Medium für die Intensität der Phytopathogenantwort der Pflanzensuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam nach Elicitation durch 400 µg HE/8 ml Zellsuspension.

Die Kulturen des 3. und 4. Tages zeigten im Vergleich zu den anderen beiden Kulturen eine geringe Responsivität, die sich in einer Photonenemission von weniger als 10000 Photonen/sec äußerte. In der Kultur des 5. Tages war die Menge an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bereits um etwa 50 % höher und in der Kultur vom 6. Tag stieg die Pathogenantwort auf knapp 30000 Photonen/sec an. Ab dem 7. Tag (nicht dargestellt) nahm die Intensität der Pathogenantwort wieder ab.

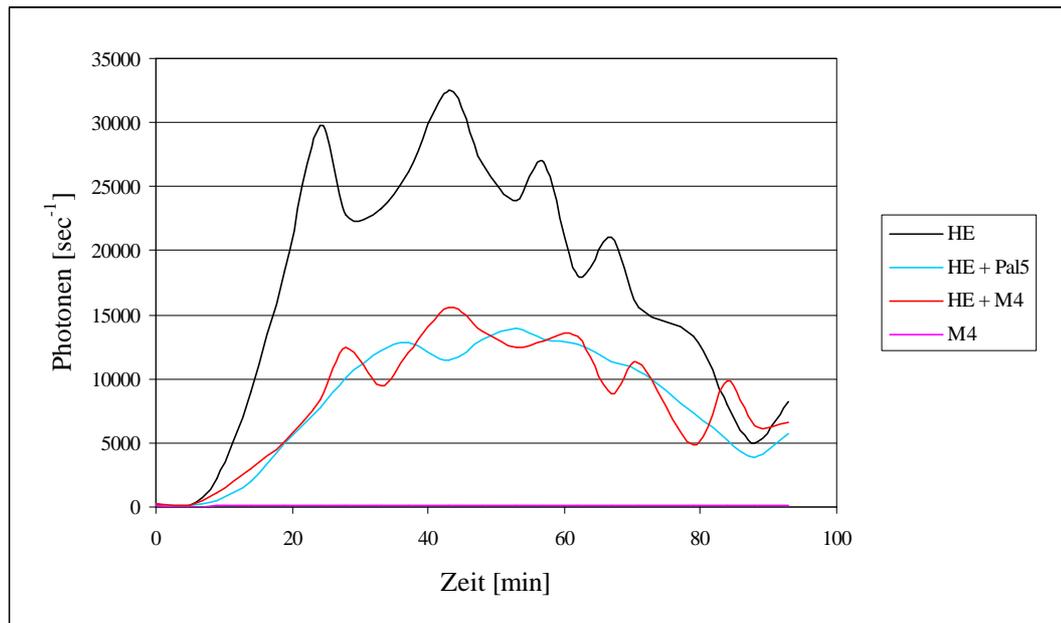
Unter den optimierten Bedingungen wurde der Einfluß des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15 auf die Elicitor induzierte Pathogenantwort der Zellen seiner natürlichen Wirtspflanze, der Süßkartoffel, untersucht.



**Abb. 4.36** Einfluß von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf die durch HE (400 µg HE/8 ml Zellsuspension) vorinduzierte Phytopathogenantwort in Pflanzensuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Die Pathogenantwort der Süßkartoffelzellen auf den HE verlief signifikant höher, als die Graphen der Kulturen, denen *Gluconacetobacter diazotrophicus* appliziert wurde. Der Endophyt in Reinform induzierte keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion durch die Pflanzensuspensionen. Wenn das Bakterium gemeinsam mit dem HE zur Pflanzensuspension gegeben wurde, blieb die Phytopathogenantwort ebenfalls aus. Dabei hatte es keinen Einfluß, ob *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 vor dem HE in die Suspension gegeben wurde (3 h), oder ob der Endophyt und der HE zeitgleich inokuliert wurden.

Abschließend wurde die Pathogenerkennung und die Induktion einer Phytopathogenantwort der Süßkartoffelzellen auf eine Spezies von *Herbaspirillum seropedicae* M4 untersucht, die bei einigen Varietäten des Zuckerrohrs eine Pathogenese (mottle stripe disease) hervorruft.



**Abb. 4.37** Einfluß von *Herbaspirillum seropedicae* M4 auf die durch HE (400 µg HE/8 ml Zellsuspension) vorinduzierte Phytopathogenantwort in Zellsuspensionen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Die Responsivität der Pflanzenzellen in der Suspension wurde durch den Ansatz mit dem HE sicher gestellt. Die Kulturen in denen neben dem HE eines der endophytischen Bakterien, entweder der Symbiont *Gluconacetobacter diazotrophicus* oder das potentielle Pathogen *Herbaspirillum seropedicae* M4, gegeben wurde, verliefen gleich. In beiden Fällen reduzierte die Zugabe der Bakterien die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion der Pflanzenzellen im Vergleich zu der Kultur, in die nur HE appliziert wurde. Die Pflanzenzellkultur, die nur mit *Herbaspirillum seropedicae* M4 inkubiert wurde, zeigte keine Abwehrreaktionen auf die Gegenwart des Bakteriums, die Photonemission blieb Null.

## 5 Diskussion

### 5.1 Modifikationen des MC für die kontinuierliche Pflanzenzellkultur

Nach den Änderungen der Hard- und Software und abschließender technischer Modifikation des Systems konnte der MC erfolgreich für die kontinuierliche Kultivierung der Suspensionskulturen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam eingesetzt werden. Die Kombination aus einer neuen Form der Kulturgefäße und der basalen Gaszufuhr durch eine Glasfritte mit Mikroporen gewährleistet einen optimalen Gaseintrag ins Kulturmedium. Der Sauerstoffeintrag in diesem Airliftfermenter entspricht dem, der in dem Vorgängersystem mit Rührwerk erzielt werden konnte. Während der Experimente mit den Süßkartoffelzellen wurde außerdem belegt, daß der Sauerstoffbedarf der Pflanzenzellen im Vergleich zu Bakterienkulturen äußerst gering ist. Dennoch wurden bei den Modifikationen des MC stets die Variabilität berücksichtigt, um neben der Kultivierung von Pflanzenzellen auch weiterhin Bakterien- und Mischkulturen durchführen zu können. Die Verwendung eines Airliftsystem wurde durch die Sensibilität der Pflanzenzellen gegenüber auftretenden Scherkräften in der Fermentereinheit notwendig. Alternativen im Bereich der Kulturbewegung und -homogenisation waren durch den Einsatz von Rührwerken nicht gegeben, denn entweder zerstörten die dabei entstehenden Scherkräfte die Pflanzenzellen, oder die Rührgeschwindigkeit reichte nicht aus, um die Kultur homogen zu halten.

Die einzigen Scherkräfte, die im MC auftreten, sind die, die beim Zerplatzen der Gasblasen an der Medienoberfläche auftreten. Diese geringen Kräfte, die intakte Pflanzenzellen mit Zellwand nicht beschädigen, reichen bereits aus, um Protoplasten zu zerstören. Protoplasten, die durch die fehlende Zellwand äußerst labil gegenüber äußeren Einflüssen sind, können aus diesem Grunde nicht im MC kultiviert werden. Die Berücksichtigung dieses Aspektes und der Versuch die Situation in der Pflanze bezüglich der Interaktionen zwischen dem Endophyten

*Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 und den Süßkartoffelzellen zu simulieren, waren für die Verwendung von Suspensionskulturen an Stelle von Protoplastenkulturen im Rahmen dieser Arbeit ausschlaggebend.

Der MC kann nach Beendigung aller Optimierungen als geeignetes Fermentersystem für die kontinuierliche Kultivierung pflanzlicher und bakterieller Zellkulturen bezeichnet werden.

Eine detaillierte Beschreibung der Veränderungen und Neuerungen, die am MC im Verlaufe dieser Doktorarbeit vorgenommen worden sind, können unter Kapitel 3 „Geräteentwicklung für Pflanzenzellkultivierung“ nachgelesen werden.

## **5.2 Medienoptimierung für die Pflanzenzellen**

Die Konzentration und das Verhältnis zwischen Cytokinin und Auxin im Kulturmedium entscheidet über die Art der Differenzierung des Pflanzenmaterials auf diesem Medium. Während durch einen Überschuß an Cytokinin ein verstärktes Sproßwachstum induziert wird, wird durch Auxinüberschuß die Wurzelbildung stimuliert. Bei gleicher Konzentration von Cytokinin und Auxin im Medium wird das Wachstum undifferenzierter Zellen, Kallus, am effektivsten gefördert. Die Konzentration von 1 mg/l jedes Phytohormons wird in der Literatur als optimale Dosis zur Induktion und Kultivierung von Kalluszellen bezeichnet (Abou-Mandour 1996).

Bei der Applikation verschiedener Auxine, NAA, IBA und IAA führte NAA zur effektivsten Kallusentwicklung. Auch nach der Passage der Zellen auf frisches Medium entwickelten sich die größten Zellgewichte auf dem Medium mit NAA und BAP. Auf dem Medium mit IBA und BAP waren die Zellmassen etwas geringer, unterschieden sich aber nicht signifikant. Auf dem Kulturboden mit den Phytohormonen IAA und BAP waren die FG der Kalluszellen signifikant niedriger als auf den anderen beiden. Dieser unterschiedliche Einfluß der Auxine auf die Zellentwicklung kann durch die Kulturbedingungen hervorgerufen worden sein. Die Kalluskulturen wurden in einer 16 h Tag- und 8 h Nachtphase inkubiert. IAA, ein natürlich vorkommendes Auxin, ist photosensitiv. Das bedeutet, das IAA

im Gegensatz zu NAA und IBA im Licht oxidiert wird und zerfällt, wodurch es als Phytohormon unwirksam wird (Sigma, Produktinformation). Diese Eigenschaft ist für die Pflanze an ihrem natürlichen Standort von geringer Bedeutung, denn IAA fördert u.a. die Induktion des Wurzelwachstums und führt dadurch zu einer verbesserten Nährstoffaufnahme und dient der Verankerung der Pflanze im Boden. Im Wurzelbereich findet keine Lichteinstrahlung statt, durch die die Aktivität des Phytohormons IAA reduziert wird. Die beiden anderen Auxine sind synthetische (NAA) oder halbsynthetische (IBA) Auxine, die im Licht stabil sind und deren Aktivitäten vom Tag-/Nachtrhythmus nicht beeinflusst werden.

Für die Optimierung der Mikroelemente wurden zwei Medienzusammensetzungen getestet. Die eine entsprach dem Original nach Murashige and Skoog (1962), die in Untersuchungen an Tabakzellkulturen entwickelt wurde, die andere der Medienzusammensetzung nach Heller (1953). Letztere wurde in Italien, am ENEA-Casaccia, Rom für die Anzucht von Süßkartoffeln in synthetischen Medien verwendet (Persönliche Kommunikation mit Dr. L. Cuzzo, ENEA-Casaccia, Rom). Die Zusammensetzung der Mikroelemente nach Heller und Murashige and Skoog sind fast identischen, jedoch eignen sich erstere, die niedriger konzentriert sind, besser sich für die Kultivierung der Süßkartoffelzellen.

### **5.3 Analyse der optimalen Parameter für die Kultivierung von Suspensionskulturen der Süßkartoffel**

Die Analysen haben die Ansprüche der Süßkartoffelzellen an die Kulturbedingungen verdeutlicht. Die Pflanzenzellen müssen mit einer minimalen Animpfdichte von 10 g/l ins neue Medium überführt werden, damit die Kulturen wachsen. Dies beruht darauf, daß in der Pflanze Zellen zu Geweben vereint sind und in diesen stetig miteinander in Kommunikation stehen. Der interzelluläre Stoffaustausch findet durch die Plasmodesmata statt. Auch die meristematischen Zellen in der Pflanze treten nach ihrem Entstehen mit den, sie umgebenden Nachbarzellen in Kommunikation. Auf diese Weise erhalten sie die Information in

welche Art Zellen sie sich differenzieren müssen. Die totipotenten Zellen, die die genetische Ausstattung haben, um sich zu jeder Zellform zu entwickeln, werden auf diese Weise durch den benachbarten Zellverband beeinflusst. Auch in reinen Kalluskulturen und Suspensionskulturen, die aus undifferenzierten Zellen bestehen, wird ein Austausch zwischen den Zellen untereinander angenommen. Dieses Zusammenspiel ist in Suspensionskulturen schwieriger als in den festeren Zellverbänden der Kalluskulturen, denn in Pflanzenzellsuspensionen treten Zell-Zellkontakte nur unregelmäßig auf und sind dann auch nur von kurzer Dauer. Folglich ist die Kommunikation in Flüssigkulturen verstärkt von Stoffen abhängig, die die Pflanzenzellen ins Medium abgeben und die Funktion von Botenstoffen ausüben. Um einen Effekt dieser Exsudate auf andere Zellen in der Suspension zu erwarten, müssen die Substanzen eine ausreichende Konzentration im Medium erreichen. Diese Konzentration korreliert direkt mit der Zelldichte im Medium, zumal undifferenzierte Zellen äußerst homogen in Suspensionen reagieren. Aus diesem Grunde führen geringe Zelldichten und eine schlechte Qualität des Inokulums zu einer Stagnation des Wachstums. Die Qualität des Inokulums hängt davon ab, wieviele intakte Pflanzenzellen passagiert werden, die durch ihre Größe sensibel gegenüber starken und unrhythmischen Bewegungen, die während des Überführens der Zellen in frisches Medium auftreten, sind.

Im Gegensatz zu den meisten Veröffentlichungen über die Kultivierung von Pflanzenzellsuspensionen (Abou-Mandour 1996) wachsen die Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam im Tag-/Nachtrhythmus besser als im Dunklen. Die Bedingungen von 16 h Belichtung und 8 h Dunkelheit entsprechen den Bedingungen, die Garcia and Cherubini (1995) in Experimenten mit ganzen Süßkartoffelpflanzen eingesetzt hat. Die Suspensionen in der Klimakammer haben eine intensive grüne Färbung, was auf die Gegenwart von Chlorophyll hinweist (Abou-Mandour 1996). Im Vergleich dazu sind Zellen, die ohne Licht kultiviert wurden, weißbräunlich. Die höheren FG in den belichteten Kulturen können auf die photosynthetische Aktivität der Zellen zurückgeführt werden. Durch die Photosynthese wird zusätzlich zum gebundenen Kohlenstoff im Medium Kohlenstoff aus der Luft für den Aufbau von Zellmasse zur Verfügung genutzt.

Die optimale Osmolarität für die Kultivierung der Süßkartoffeln in Zellsuspension liegt im Bereich von 260 mOsmol/kg, ab 490 mOsmol/kg wuchsen die Zellen nicht mehr. Letzteres Ergebnis ist von besonderem Interesse, denn Protoplastenkulturen werden in Medien kultiviert, die 500-600 mOsmol/kg sind und dadurch werden isotonische Verhältnisse zwischen dem Außenmedium und Cytoplasma der Protoplasten erzeugt. Diese Osmolarität tolerieren die meristematischen Zellen mit intakter Zellwand nicht und stellen das Wachstum ein. In dem Medium für die Suspensionskulturen der Süßkartoffel würden die Protoplasten lysieren.

Der optimale pH-Wert des Mediums (pH 5,5) für die Kultivierung der Pflanzenzellen entspricht dem pH, der im Apoplasten vorherrscht (James and Olivares 1997) und der für die Kultivierung von Pflanzenzellkulturen aus der Literatur entnommen werden kann (Murashige and Skoog 1962). Dieser pH-Wert stellt ebenfalls das Optimum für die Anzucht von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 dar (Stephan et al. 1991), das als Endophyt an die Bedingungen im Pflanzeninneren adaptiert ist.

Das Wachstum auf Medien mit unterschiedlichen Saccharosekonzentrationen belegten, daß in den Originalmedien die C-Quelle im Überschuß vorliegt. Die Reduktion der Saccharosekonzentration von 30 auf 20 g/l verändert die Wachstumskurve der Pflanzenzellsuspensionen nicht. Erst bei 10 g/l Saccharose wird in der Kultur signifikant weniger Zellmasse entwickelt, wodurch eine Limitation des Wachstums durch die C-Quelle angezeigt wird. Eine weitere Reduktion des Zuckergehaltes im Medium limitiert das FG der Zellen in der Kultur zunehmend und ohne Saccharose findet kein Wachstum mehr statt. In allen Ansätzen, bis auf den ohne Saccharose, erhöhte sich die Teilungsrate der Zellen ca. ab dem 13 Tag noch einmal. Dieses Phänomen, das regelmäßig in den Suspensionskulturen zu verfolgen ist, kann auf die Photosynthese der Zellen zurückgeführt werden. Bis zu diesem Tag verwerten die Zellen hauptsächlich die im Medium verfügbare C-Quelle und produzieren, entsprechend der vorhandenen Zuckerkonzentration, Zellmasse. Dann scheint eine weitere C-Quelle zur Verfügung zu stehen, denn die Wachstumsrate steigt deutlich an. Dies könnte

durch einen additiven Effekt der Photosynthese hervorgerufen werden. Diese zweite Wachstumsphase hält 3-4 Tage an und endet danach in einer stationären Phase. Es ist anzunehmen, daß das Zellwachstum zu diesem Zeitpunkt durch einen anderen Parameter begrenzt wird, der nicht genauer determiniert wurde. Während des Wachstums ohne Saccharose findet diese zweite Wachstumsphase nicht statt, folglich können die suspendierten Zellen der Süßkartoffel keine weitere C-Quelle erschließen. Der Saccharose, von der eine Mindestkonzentration im Medium vorliegen muß, ermöglicht das Wachstum der Zellen und fördert deren Fitneß. Entsprechend der Situation für *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 auf stickstofffreiem Flüssigmedium, dem eine Starterdosis von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  beigelegt werden muß, damit das diazotrophe Bakterium Luftstickstoff fixiert (Stephan et al. 1991), könnte der Saccharose ebenfalls die Rolle einer Starterdosis für die Aktivierung der Photosyntheseaktivität der Pflanzenzellen unter diesen Bedingungen zukommen.

#### **5.4 Interaktionsexperimente im statischen System**

Die wesentliche Voraussetzung für die Interaktionsexperimente ist, daß Mischkulturen zwischen *Ipomoea batatas* (L.) Lam und *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 möglich sind, ohne daß eine der Spezies die andere überwächst oder lysiert. Die Beobachtung in den Mischkulturen bestätigt die Theorie von James et al. (1994), daß *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 keine aggressive Penetration, d.h. keine aktive Lyse von Wirtspflanzenzellen, durchführt. Der Endophyt kann lediglich über Verletzungen der Pflanze in diese eindringen. In den Mischkulturen treten keine Anzeichen einer Phytopathogenantwort der Süßkartoffel gegenüber dem Bakterium auf. Diese Beobachtung wird von Sevilla et al. (1997) und Caballero-Mellado (1994) bestätigt, die in Untersuchungen mit Süßkartoffelpflanzen und *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ein Ausbleiben einer Phytopathogenantwort während der Kolonisation der Pflanze durch den Endophyten beschrieben haben.

Das Wachstumsverhalten des Kallus von *Ipomoea batatas* (L.) Lam auf den Medien ohne Saccharose belegt, daß den Pflanzenzellen in dieser Versuchsanordnung (4.3.2.1) eine andere verwertbare C-Quelle als Saccharose zur Verfügung steht. Diese könnte eine der weiteren drei Kohlenstoffquellen im Medium (Casein, Inosit, Malat), interne Speichersubstanzen der Pflanzenzellen oder Photosyntheseprodukte sein. Der Vergleich mit den Schüttelkulturen aus dem Substratlimitationsexperimenten (4.3.1) schließt die Verwertung einer Kohlenstoffkomponenten aus dem Medium neben der Saccharose und von internen Speichersubstanzen der Zellen aus. Die Pflanzenzellen in den Suspension können ohne Saccharose nicht wachsen, verfügen folglich über keine C-Quelle. Damit verbleibt als einzige Kohlenstoffquelle das CO<sub>2</sub>, das im Verlauf der Photosynthese fixiert wird. Der Kallus, der auf Teflonscheiben ausgelegt war (4.3.2.1), wuchs unter diesen Photosynthesedingungen schneller als die suspendierte Zellen, die eine Starterdosis an Saccharose benötigen, um photosynthetische Aktivität zu entwickeln. Dies kann auf der geringeren Lichtintensität beruhen, die den Zellen in den Suspensionskulturen zur Verfügung stehen. Bevor die suspendierten Zellen das Licht photosynthetisch nutzen konnten, mußte es in diesen Ansätzen drei Grenzflächen zwischen verschiedenen Ausbreitungsmedien (Luft → Glas, Glas → Luft, Luft → Kulturmedium) durchdringen. Beim Durchtreten einer Grenzfläche wird immer ein Teil der eingestrahnten Lichtmenge reflektiert, wodurch die Lichtintensität nach dem Durchtritt im neuen Ausbreitungsmedium, im Vergleich zur eingestrahnten Lichtmenge, abnimmt. In den Kulturröhren müssen nur zwei Grenzflächen durchtreten werden (Luft → Glas, Glas → Luft) bevor der Kallus das Licht photosynthetisch nutzen kann. Die Lichtintensität ist in diesen Kulturröhren höher als in den Schüttelkulturen, wodurch die Zellmasse in den Röhren schneller zunahm. Im Verlauf des Experimentes wurde das Wachstum dann durch eine andere Komponente im Medium limitiert.

In den Reinkulturen beginnt das Wachstum der Kalluszellen früher als in den Mischkulturen mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa5 (4.3.1). Dies ist ein Resultat der Konkurrenz beider Spezies um das Substrat, wobei die Bakterien

durch ihre höhere Teilungsrate bei der Medienverwertung bevorteilt sind. Erst nach Erreichen der stationären Phase des Endophytenwachstums, beginnt die Zellmassenzunahme des Kallus. Die Bakterien nutzen anfangs das Casein als C-Quelle und können dadurch auf dem saccharosefreien Medium wachsen (Schulze 1999). Dabei verwerteten sie einen großen Teil der anderen Medienkomponenten (Makroelemente, Mikroelement usw.), die den langsamer wachsenden Pflanzenzellen nicht mehr, oder nur in reduzierter Menge zur Verfügung stehen. Auf diese Weise wird das Wachstum der Pflanzenzellen zu Kulturbeginn in der Mischkultur gehemmt. In der Absterbephase des Endophyten werden diese Medienbestandteile in indirekter Form, d.h. durch die Lyse der abgestorbenen Bakterien für die Pflanzenzellen verfügbar und das FG nimmt zu. Ab dem 15. Kulturtag steigt die Lebendzellzahl von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 wieder an und endet in einem Gleichgewicht zwischen Bakterienzahl und Kalluszellgewicht. Ab dem 17. Tag stellte sich dieses Gleichgewicht ein. Dies ist eine Voraussetzung für den Endophyten und die Wirtspflanze, um eine Partnerschaft zu beiderseitigem Nutzen zu entwickeln, die über einen längeren Zeitraum bestand hat. Die zweite Wachstumsphase von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 muß auf den Einfluß der Pflanzenzellen zurückgeführt werden, denn in der Reinkultur kann sie nicht beobachtet werden, wobei die beteiligten Mechanismen noch nicht weiter untersucht wurden.

Auch auf dem stickstofffreien Medium verläuft das Wachstum von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in der Rein- und Mischkultur bis zum 15. Kulturtag identisch. Danach findet in der Mischkultur ebenfalls eine zweite Zellzunahme statt, wie sie auch auf dem saccharosefreien Medium beobachtet wurde. Die Lebendzellzahl stabilisierte sich bei einer CFU von  $1,7 \cdot 10^6$  Zellen/ml, was um etwa eine 10er Potenz niedriger ist, als die CFU von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, die in Experimenten von James et al. (1994) nach Freilandversuchen aus Zuckerrohrstücken von 1 g isoliert worden sind. Die Revitalisierung der Bakterien in der Mischkultur basiert auch in diesem Experiment auf einer Versorgung durch die Pflanzenzellen. Dadurch, daß die Kalluszellen von der Präsenz des Endophyten, u.a. von der Stickstofffixierung,

profitieren, finden wachstumsteigernde Interaktionen zwischen beiden statt. Diese Zunahme des FG konnte bei verschiedenen Pflanzen, z.B. der Süßkartoffel (Paula et al. 1992) und dem Zuckerrohr (Fuentes-Ramirez et al. 1993) nach Inokulation mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 nachgewiesen werden. Neben der Ertragsteigerung der Pflanze durch die Interaktionen mit dem diazotrophen Bakterium, kann die Pflanze durch die Versorgung mit fixiertem Luftstickstoff neue, stickstoffärmere Standorte besiedeln (James and Olivares 1997). Dabei wird die Nitrogenaseaktivität des Endophyten durch die Präsenz der Pflanzenzellen stimuliert, was durch die ARA-Messungen (Abb. 4.18) belegt wird. Die Menge gebildeten Ethens liegt in der Mischkultur mit 90 nmol/h mehr als doppelt so hoch, wie die Nitrogenaseaktivität in der bakteriellen Reinkultur. Den gleichen Effekt wies James et al. (1994) bei Messungen von Pflanzenstücken des Zuckerrohrs, die mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 besiedelt waren, nach. In diesen Experimenten, in denen die Bakterienzahlen um eine 10er Potenz pro mg höher waren als in 1 ml der Suspensionen der Experimente unter 4.3.2.2, wurde die Umsetzungsrate mit 102 nmol/h bilanziert.

Diese Stimulation der Nitrogenaseaktivität in Mischkultur könnte einerseits durch Signalsubstanzen hervorgerufen werden, oder auch auf Zellkontakt beruhen, wodurch die Existenz von Rezeptoren in den Zellwänden gefordert werden müßte. Die Rezeptortheorie könnte unter Verwendung von Protoplastenkulturen genauer untersucht werden.

In Schüttelkulturen (4.3.1) konnte der positive Effekt der Coexistenz von Süßkartoffelzellen und dem natürlichen Endophyten ebenfalls nachgewiesen werden. Aus den Mischkulturen konnten bis zum Absterben der Pflanzenzellen auch vitale Bakterien in einer Größenordnung von  $10^4$  Zellen/ml isoliert werden, während in den bakteriellen Reinkulturen ab spätestens dem 17. Kulturtag keine CFU mehr nachweisbar waren. Auch in den Suspensionskulturen bleiben die Bakterien durch die Coexistenz mit den Pflanzenzellen vital. Das Wachstumsverhalten der Pflanzenzellen in den Suspensionskulturen unterscheidet sich hingegen von denen in den Kulturröhrenexperimenten (4.3.2). Die Zellen in der Mischkultur wachsen vom ersten Kulturtag an und die Zellmasse nimmt

stärker zu als in den Reinkulturen. Dieser Effekt könnte zum Teil auf den höheren Gehalt von IAA in den Mischkulturen zurückgeführt werden. IAA ist ein Phytoeffektor, der u.a. die Zellstreckung von Pflanzenzellen induziert. Es ist nachgewiesen, daß *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ebenfalls in der Lage ist dieses Auxin zu produzieren (Fuentes-Ramirez et al. 1993) und dadurch das Wachstum seiner Wirtspflanze positiv zu beeinflussen. Bereits mit Beginn der stationären Phase des Bakterienwachstums, in der die sekundären Metabolite in Bakterienkulturen gebildet werden, ist die pflanzliche Zellmasse in den Mischkulturen deutlich höher als in den Reinkulturen. Bei der Kultivierung von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 wurden im Medium zu diesem Zeitpunkt 0,18 µg/ml IAA nachgewiesen. Diese Konzentration liegt in dem Bereich, den Fuentes-Ramirez et al. (1993) für ein Isolat aus mexikanischem Zuckerrohr bilanziert haben (0,14-2,42 µg/ml). Am 6. Kulturtag ist die IAA Konzentration in der Mischkultur von 0,806 auf 3,093 µg/ml angestiegen und ist im Vergleich zu der Summe der respondierenden Reinkulturen etwa vier Mal höher als diese. Die Interaktion zwischen Endophyten und Wirtspflanze steigert demnach die Effektorkonzentration, was eine Zunahme der pflanzlichen Zellmasse bewirkt. Dies bietet eine Erklärung für die Wachstumssteigerungen, die Wirtspflanzen durch den Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 erfahren (Paula et al. 1992), die über den Aspekt der Bereitstellung von fixiertem Luftstickstoff hinausgeht. Da der Endophyt in seiner Wirtspflanze zum Teil in den Nodien, den Wurzeln und im Xylem lokalisiert ist, Bereiche, die im Dunklen liegen oder eine hohe Dichte haben, wird produzierte IAA, die photooxidativ ist, nicht so stark dem Licht ausgesetzt. Dadurch könnte die Wirkung des Phytohormons auf die Pflanze durch eine gesteigerte Halbwertszeit zusätzlich zur Konzentrationserhöhung zunehmen. Besonders die Besiedlung des Xylems durch den Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 erscheint interessant, denn die IAA und auch andere Produkte, wie z.B. fixierter Stickstoff können über das Gefäßsystem systemisch verteilt werden.

## 5.5 Interaktionsexperimente im Multiplen Chemostaten

Die Interaktionsexperimente im MC bedeuten die größt mögliche Annäherung der Laborversuche an die natürliche Situation in der Pflanze im Freiland. Die Pflanze stellt ein kontinuierliches System dar, dem permanent verfügbare Nährstoffe zugeführt und Stoffwechselprodukte entzogen werden. Letzteres kann durch Einbau, Einlagerung oder Abgabe dieser Produkte stattfinden. Im MC werden diese Bedingungen in der kontinuierlichen Kultur ebenfalls durchgehend kontrolliert und geregelt. Dennoch kann die reale Situation in der Pflanze auch durch diese Versuchsanordnungen nur unzureichend dargestellt werden, denn die Interaktionen zwischen Pflanzen und Endophyten unterliegen einer Vielzahl von weiteren Einflüssen, die nicht simuliert werden können. Besonders zu erwähnen ist dabei z.B. die mikrobielle Konkurrenz, der *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 in der Pflanze ausgesetzt ist. Dadurch ist ein Transfer der Laborergebnisse auf die natürliche Situation nicht ohne weiteres zulässig, sondern die Resultate können nur dazu verwendet werden, die Beobachtungen, die bei Freilandversuchen gemacht wurden, zu diskutieren und teilweise zu erklären.

Die wachstumsphysiologischen Untersuchungen im Labormodell belegen einen gegenseitigen positiven Einfluß zwischen den Pflanzenzellen und den Bakterien. Die Steigerung der Wachstumsraten der Pflanzenzellen in der Mischkultur mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 führt dazu, daß die Süßkartoffel schneller wachsen kann, wenn sie von dem Endophyten kolonisiert ist. Schnelleres Wachstum ist in der Natur gleichbedeutend mit größerer Wettbewerbsfähigkeit und Durchsetzungsvermögen gegenüber Konkurrenten und für die Landwirtschaft bedeutet es eine höhere Wirtschaftlichkeit. Neben der Steigerung der Teilungsrate der Pflanzenzellen unterstützt *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 das Wachstum seiner Wirtspflanzen noch auf weitere Arten. Elementar ist dabei die Stickstofffixierung (Boddey et al. 1995), die ebenfalls in gesteigerter Rate in den Mischkulturen bilanziert und über die Isotopenverdünnungsmethode nachgewiesen wurde. Die Effektivität der Fixierung und die damit verbundene Versorgung der Pflanze mit gebundenem Luftstickstoff ist abhängig von der

Anzahl und der Vitalität der diazotrophen Bakterien. Im Falle von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 wird der fixierte Stickstoff in Mischkultur bis zur Hälfte ins Medium abgegeben (Cojho et al. 1993). Dadurch wird er im Gegensatz zu anderen endophytischen, diazotrophen Bakterien nicht erst nach dem Absterben der Bakterien für die Wirtspflanze verfügbar, sondern bereits während die Bildung der sekundären Metabolite beginnt. Die Form in der der gebunden Stickstoff durch *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 abgegeben wird ist  $\text{NH}_4^+$ , das ohne Modifikation von der Pflanze in die Glutaminsynthese eingeschleust werden kann. Folglich hat die im MC nachgewiesene Erhöhung der Teilungsraten des Endophyten in der Mischkultur einen positiven Effekt für die Stickstoffversorgung der Süßkartoffel, die bis zu 60 % ihres Gesamtstickstoffs aus der BNF erhalten kann (Döbereiner et al. 1993). Auch die bakterielle IAA Produktion steigt durch den verbesserten Status und die erhöhte Zahl der Zellen an, wodurch die Pflanze verstärkt zum Wachstum angeregt wird. IAA, das zur Gruppe der Auxine gehört, induziert nach Translokation, normalerweise aus den Blättern (Bildungsort) in die Wurzelbereich (Wirkort), die Wurzelbildung. Die additiv gebildete Menge an bakterieller IAA steigert somit auch die Verwurzelung der Pflanze, die dadurch über eine größere Oberfläche Nährstoffe und Wasser aus dem Boden aufnehmen kann (Sumner 1990). Diese verbesserte Nährstoff- und Wasserversorgung der Pflanze ist auch bei *Sorghum vulgare* nachgewiesen worden, der mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 und *Glomus clarum*, einem Vertreter der Vesicular Arbuscular Mykorrhiza (VAM), inokuliert wurde (Paula et al. 1991; Isopi et al. 1995). Auf diesem Wege wird ihr Wachstum weiter verbessert. Ein anderer positiver Aspekt, der mit der Anzahl der Endophyten in der Pflanze zusammenhängt ist der Konkurrenzdruck der durch diese synergistische Bakterien auf pathogene Mikroorganismen ausgeübt wird. Dabei spielt neben der Nährstoffkonkurrenz auch der Wettbewerb um das Platzangebot eine wichtige Rolle. Auf diesem Wege kann *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 zur verbesserten Entwicklung seiner Wirtspflanze beitragen.

Auch der Endophyt profitiert von der gesteigerten Wachstumsrate in Kombination mit den Pflanzenzellen, denn *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 ist eine der

Spezies mit geringer Teilungsrate im Vergleich zu vielen seiner mikrobiellen Konkurrenten. Daher ist jede Steigerung der Teilungsrate eine Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit in der Pflanze und dient der Arterhaltung. In Kombination mit den Fähigkeiten das Disaccharid Saccharose nach extrazellulärer Spaltung zu verwerten und niedrige pH Werte (unter pH 3) zu tolerieren, verschafft dem Endophyten bei der Besiedlung der Süßkartoffel und anderen saccharosehaltigen Wirtspflanzen einen Selektionsvorteil.

Die Wettbewerbsfähigkeit von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 könnte durch die Zugabe weiterer Endophyten noch gesteigert werden. Dieser Synergismus zwischen zwei diazotrophen Endophyten, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 und *Herbaspirillum seropedicae* Z67, wurde in Mischkultur im Chemostaten gemessen (Kalippke 1996). Die Interaktionen zwischen diesen Bakterien auf saccharosehaltigen Medien bewirken eine erhöhte Teilungsrate bei *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *Herbaspirillum seropedicae* Z67, das nicht in der Lage ist Saccharose als C-Quelle zu verwerten, nutzt die Produkte der extrazellulären Saccharosespaltung und profitiert in dieser Weise von der Coexistenz mit *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. Durch eine Reihe von Untersuchungen wird die Theorie, daß Mischinokulate das Wachstum der Wirtspflanze effektiver steigern können als Inokulate einzelner Endophytenspezies bestätigt (Paula et al., 1992). Neben den synergistischen Effekten zwischen zwei und mehreren Endophyten führt die Kombination dieser Bakterien mit VAM ebenfalls zu Wachstumsteigerungen der Pflanzen. In der Süßkartoffel bewirkt der Pilz, daß *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 die Pflanze systemisch besiedelt und die Zellzahlen des Endophyten zunehmen (Paula et al. 1991), wodurch die zuvor beschriebenen positiven Effekte des Bakteriums auf seine Wirtspflanze gesteigert werden (Isopi et al. 1995).

## 5.6 Pathogenantwort

Pflanzen reagieren auf den Befall durch pathogene Mikroorganismen mit einer präformierten, d.h. einer unabhängig vom Befall natürlich vorhandenen und einer durch die Infektion ausgelöste induzierte Abwehrreaktion. Der mikrobiell induzierte Anteil dieser präformierten Phytopathogenantwort wird in drei Kategorien unterteilt (Kombrink and Somssich 1995). Diese drei Klassen sind die schnelle, frühe Pathogenantwort, die Aktivierung lokaler Abwehrmechanismen und die systemisch induzierte Abwehrreaktion in den nicht infizierten Geweben. Die schnelle Pathogenantwort beinhaltet die Erkennungssequenz, die Initialisierung der Signaltransduktion und erste Reaktionen gegen das Pathogen (Dixon et al. 1994, Ebel and Cosio 1994). Mehrere Reaktionen, die in diesem Stadium der Pathogenantwort stattfinden, konnten auch für elicitierte Pathogenantworten in Zellkulturen nachgewiesen werden. Die Veränderung des Membranpotentials (Mathieu et al. 1991, Atkinson et al. 1993, Nürnberger et al. 1994) und die daraus resultierende Alkalisierung des Kulturmediums bei mikrobiellem Pathogenbefall oder durch Elicitorzugabe zu Pflanzenzellsuspensionen ist eine etablierte Methode, um die Intensität der Phytopathogenantwort in Zellsuspensionen zu quantifizieren. Diese Methode wurde für die Experimente der Alkalisierungsmessung (4.5.1) verwendet, in denen der HE, der in Luzerne-, Tomaten und Tabakkulturen eine Abwehrreaktion der Pflanzenzellen induziert, auf seine elicitierende Wirkung in Süßkartoffelzellsuspensionen untersucht wurde. Der HE bewirkte in diesen Suspensionen ebenfalls eine Alkalisierung des Außenmediums, die mit 0,4 pH Einheiten denen der Tomate und des Tabaks entsprach. Die höheren Werte in den Luzernekulturen beruhen auf einer steten Selektion der Kulturen auf maximale Pathogenreaktion und der Optimierung des Meßsystems auf diese Pflanzenzellen (persönliches Gespräch mit Dr. rer. nat. K. Niehaus, Genetik, Universität Bielefeld).

Die Bildung von aktiven Sauerstoffspezies (AOS), die die Bildung von  $H_2O_2$ , den „oxidative burst“, beinhalten, gehört wie die Änderung des Membranpotentials zur

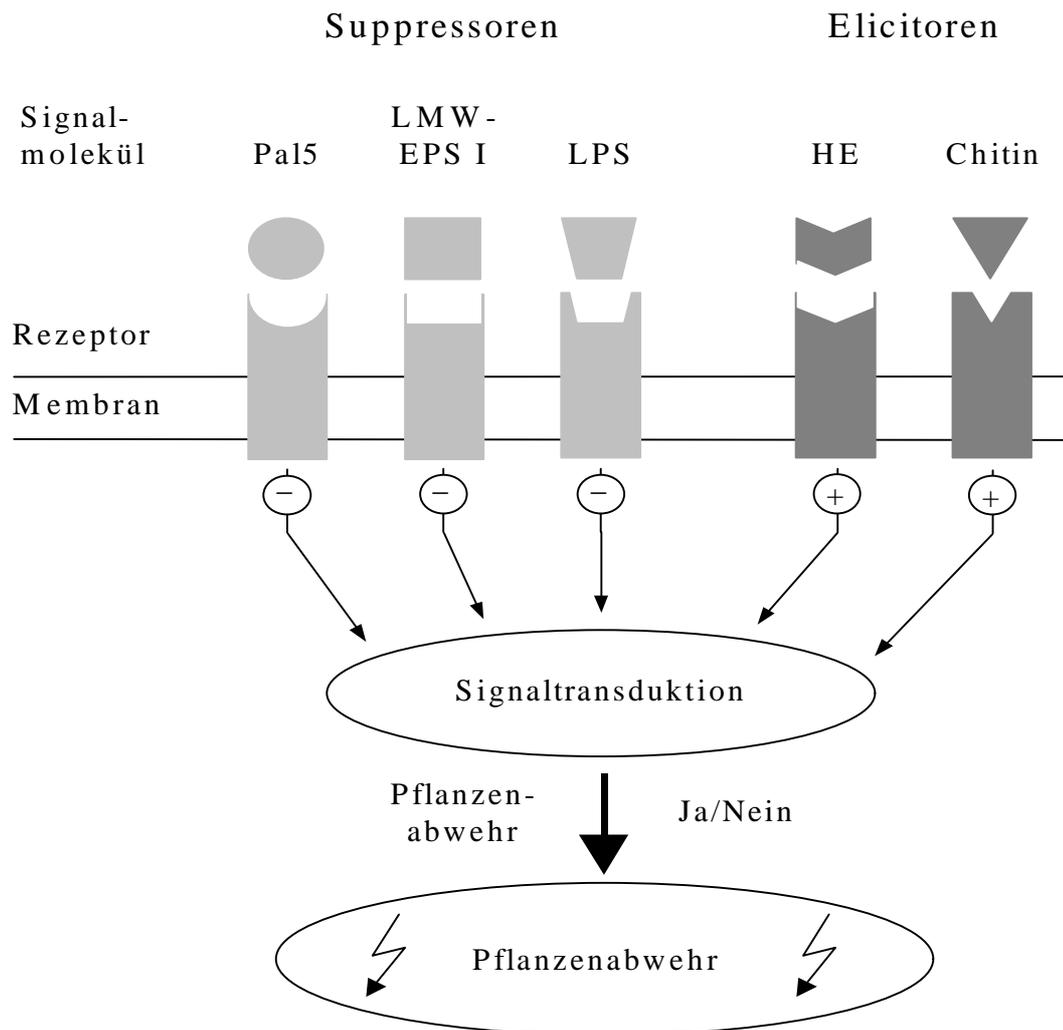
frühen Pathogenantwort (Mehedey 1994, Tenhaken et al. 1995). Dies läßt sich für eine genauere Messung der Abwehrintensität der suspendierten Pflanzenzellen nutzbar machen (2.6.2). Auch in diesem Meßsystem wurde die Wirksamkeit des HE auf Süßkartoffelzellen nachgewiesen. Die Änderungen der Kulturbedingungen und die bevorzugte Weiterkultivierung von Zellkulturen mit hoher Responsivität, die im Laufe dieser Arbeit stattfand, führt dazu, daß sich die maximale Intensität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion mit Fortschreiten dieser Arbeit veränderte und zunahm. Dadurch ist ein absoluter Vergleich zwischen allen Experimenten nicht legitim, sondern in diesem Fall können lediglich die Tendenzen miteinander in Bezug gesetzt werden. Innerhalb eines Versuches hingegen, wurden alle Ansätze und Parallelen aus einer Vorkultur, d.h. mit Zellen gleicher Responsivität angesetzt.

Bei der Pathogenreaktion der Süßkartoffelzellen auf den HE handelt es sich um eine inkompatible Wirt-Pathogenbeziehung, was in diesem Testsystem durch zwei aufeinander folgenden Maxima der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion gekennzeichnet ist. Am natürlichen Standort würde dies bedeuten, daß sich der Elicitor, sprich das Pathogen nicht im Pflanzeninneren etablieren kann.

Die optimalen Kulturbedingungen für eine Vorkultur, um eine maximale Phytopathogenantwort nach Elicitorzugabe zu erzeugen, entsprechen denen, die als optimal für das effektivste Wachstum der Pflanzenzellen in Suspension ermittelt wurden. Diese Bedingungen wirken sich positiv auf die Vitalität der Süßkartoffelzellen aus, was durch die Wachstumsrate und eine starke Pathogenabwehr protokolliert wird.

Die Addition des natürlichen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 bewirkte keinen Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Entwicklung im Vergleich zu den Kontrollen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für das Vorkommen des Bakteriums in der Wirtspflanze ist und es entspricht den Beobachtung von Sevilla et al. (1997) und Caballero-Mellado et al. (1994) für die Gesamtpflanze. Die Reduktion, der durch den HE vorinduzierte Pathogenantwort durch Applikation von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 läßt vermuten, daß ein Erkennungsmechanismus zwischen den Pflanzenzellen und dem Endophyten besteht. Hierbei kann es sich um den gleichen Rezeptor handeln an dem der HE

bindet und der in Modellen bezüglich der Pathogenantwort postuliert wird (Abb. 5.1). Nach Besetzung dieses Rezeptors durch den Elicitor wird eine Signaltransduktionskette in Gang gesetzt, deren Resultat die verschiedenen Abwehrreaktionen der drei Kategorien sind. Diese Theorie des gleichen Rezeptors geht davon aus, daß eine Konkurrenz zwischen Endophyten und HE um den Rezeptor besteht. Dies würde bedeuten, daß die Reduktion der vorinduzierten Pathogenantwort durch eine Steigerung der HE-Konzentration aufgehoben werden müßte, ähnlich den Verhältnissen einer kompetitiven Hemmung in der Enzymkinetik. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlicher ist die Theorie, daß es sich bei der induzierten Signaltransduktionskette, die durch die Bindung des HE ausgelöst wird, um ein Signaltransduktionsnetz handelt. Nach der Erkennung des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, eventuell über einen anderen Rezeptor, wird in der Pflanzenzelle eine weitere Signaltransduktion ausgelöst, die an unbekannter Stelle in das Netz der Pathogenabwehr eingreift und dadurch die Auslösung der Abwehrreaktionen unterbindet. Ähnliche Ergebnisse hat Baier (1996) für den Einfluß von Lipopolysacchariden und niedermolekularem Succinglykan von *Rhizobium meliloti* auf die Unterdrückung einer vorinduzierten Pathogenantwort in der Symbiose mit *Medicago sativa* postuliert. Auch in diesen Experimenten konnte eine Pathogenantwort der Pflanzenzellen, die durch HE oder Chitinoligomere (Chitin) induziert wurde, durch Lipopolysaccharide (LPS) oder niedermolekulares Succinglykan (LMW EPS I) des symbiontischen Bakteriums unterdrückt werden.



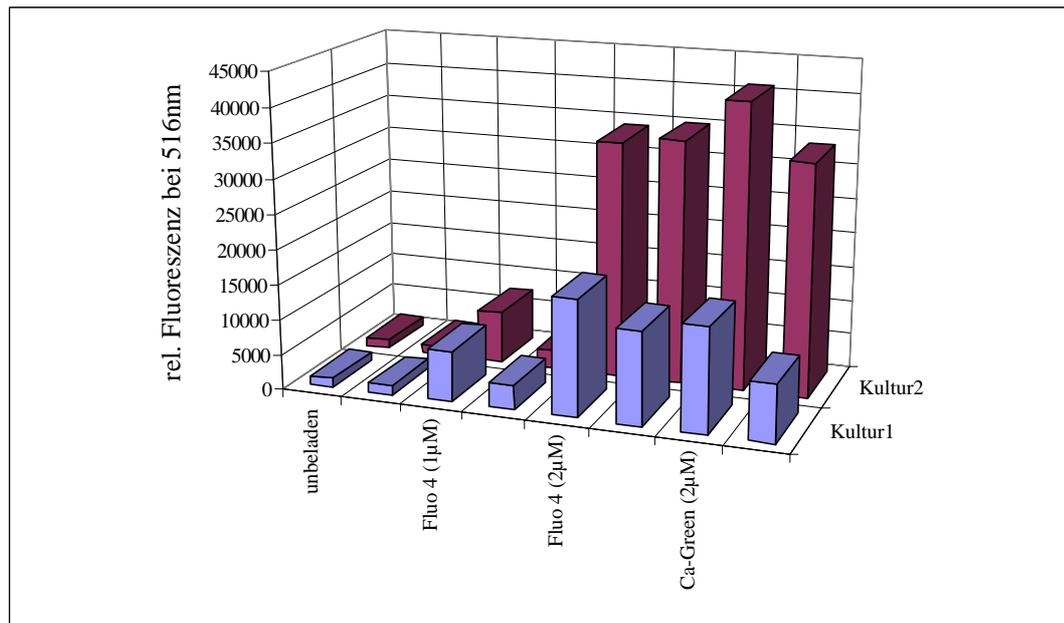
**Abb. 5.1** Modifiziertes symbiontisches Elicitor-Suppressor Modell.

Diese Repressionen sind von den Konzentrationsverhältnissen zwischen Endophyten und Elicitor unabhängig. Geringste Konzentrationen des Bakteriums reichen aus, die Pathogenantwort zu verhindern, was für einen effektiven und schnellen Signaltransduktionsweg spricht und eine Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedlung der Wirtspflanze durch den Endophyten darstellt. Diese Repression der Phytopathogenantwort scheint zunächst einen Nachteil für die Wirtspflanze darzustellen, denn in Gegenwart des Endophyten kann sie nicht gegen Pathogene reagieren. Die Pflanzenabwehr findet nur dann statt, wenn sich der pathogene Mikroorganismus gegen *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 durchsetzen kann. Dadurch profitieren sowohl die Pflanze, als auch der Endophyt

von der Verzögerung der Pathogenantwort. Die Süßkartoffel hat den Vorteil, daß sie nicht auf alle, sondern nur auf die Mikroorganismen reagieren muß, die sich gegen *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 durchgesetzt haben. Die Präsenz des Endophyten bildet also eine Vorstufe der Abwehrreaktionen der Pflanze und dafür ist er nicht bei jedem Auftreten einer pathogenen Spezies, selbst wenn deren Kolonisationsversuch nicht erfolgreich ist, der Phytopathogenantwort von *Ipomoea batatas* (L.) Lam ausgesetzt.

Doch auch pathogene Spezies scheinen sich dieser Methode zu bedienen, um Wirtspflanzen zu besiedeln. *Herbaspirillum seropedicae* M4, ein endophytisches Bakterium, das u.a. die *mottle stripe disease* bei einigen Zuckerrohrspezies auslöst, ist ebenfalls in der Lage, die durch HE vorinduzierte Pathogenantwort zu reduzieren. Die Verläufe der  $H_2O_2$  Entwicklung nach Zugabe von *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 bzw. *Herbaspirillum seropedicae* M4 sind nahezu identisch, was darauf hindeutet, daß beide Endophyten die gleichen, zumindest aber gleich effektive Signaltransduktionswege zur Inhibierung der Phytopathogenantwort der Süßkartoffelzellen induzieren. Die Effektivität mit der *Herbaspirillum seropedicae* M4 die Süßkartoffelzellen beeinflusst, zeigt sich darin, daß in dem Ansatz in dem nur das Bakterium zu den Pflanzenzellen appliziert wurde, kein  $H_2O_2$  produziert wird. Sogar die charakteristischen Mengen, die aufgrund der Probenhandhabung (Streß beim Schütteln und der Probenahme) in den Kontrollen, die nur aus Pflanzenzellen bestehen, abgegeben werden, werden unterdrückt. Auf diese Weise könnte sich das Pathogen der Phytopathogenantwort seiner Wirtspflanze entziehen.

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der Pathogenantwort bietet zukünftig die Messung der  $Ca^{2+}$  Konzentration. Die Ionenkonzentration, speziell die des Calciums, das in der Zelle als second messenger fungiert (Helper and Wayne 1985; Sanders et al. 1994), gehört wie auch die  $H_2O_2$  Produktion und die Änderung des Membranpotentials zu den schnellen, frühen Pflanzenabwehrantworten (Mathieu et al. 1991, Atkinson et al. 1993, Nürnberger et al. 1994). Die Beladung der Pflanzenzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden.



**Abb. 5.2** Änderung der relativen Fluoreszenz zur Überprüfung des Beladungszustandes mit  $\text{Ca}^{2+}$  von suspendierten Zellen von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

Im Vergleich zu den zuvor verwendeten Methoden können die Calciummessungen nicht mit Suspensionen durchgeführt werden, die im Tag-/Nachtrhythmus kultiviert wurden. Die grünen Zellen zeigen eine zu starke Autofluoreszenz, wodurch die des AM-Farbstoffes überlagert wird. Daher müssen für diese Analysen, die in dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden konnten, Kulturen verwendet werden, die bereits über mehrere Kulturperioden im Dunklen inkubiert worden sind.

## 5.7 Ausblick

Im MC können die Interaktionen weiterer Pflanzen-Endophytenpaare auf zellulärer Ebene untersucht werden und deren Einfluß auf die Wachstumsphysiologie beider Spezies analysiert werden. Auch Mischinokulationen, die bei Freilandversuchen effektivere Wachstumsverbesserungen der Wirtspflanzen hervorgerufen haben, können auf diese Weise im MC simuliert werden.

Dieses System stellt zusätzlich die Grundlage für die Analyse der stoffwechselfysiologischen Interaktionen dar, die sich in dieser Arbeit aufgrund des vorgegebenen Zeitrahmens auf die IAA-Produktion und die Stickstofffixierung beschränken mußte.

Die Etablierung des Systems zur Messung der Phytopathogenantwort der Süßkartoffel und dessen Verwendbarkeit für weitere Zellkulturen läßt auf diesem Wege eine Vorhersage über die Toleranz der Versuchspflanzen gegenüber einzelnen Mikroorganismenspezies zu.

## 6 Literatur

- [1] ABOU-MANDOUR AA (1996) Zell- und Gewebekulturen – ihre Bedeutung für die Pflanzenforschung. *Biologie in unserer Zeit* **26**: 35-42
- [2] ATKINSON M, BINA J, SEQUEIRA (1993) Phosphoinositide breakdown during the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange response of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 253-260
- [3] ATTWOOD MM, VANDIJKEN JP, PRONK JT (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng* **72**: 101-105
- [4] BAIER R (1996) Nachweis der wirtsspezifischen Suppression der Pflanzenabwehr in der *Rhizobium meliloti*-*Medicago sativa*-Symbiose durch Messung der Elicitor-induzierten Alkalisierung von pflanzlichen Zellkulturmedien. *Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld*
- [5] BERGERSEN FJ (1980) Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: *Methodes for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Ed FJ Bergersen. John Wiley and Sons, Chichester: pp. 65-110
- [6] BLAKESLEY D, ALMAZROOEI S, BHATTI MH, HENSHAW GG (1996) Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Plant Cell Reports* **15** (11): 873-876
- [7] BODDEY RM, DÖBEREINER J (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant Soil* **108**: 53-65
- [8] BODDEY RM, URQUIAGA S, REIS V, DÖBEREINER J (1991) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. In: *M. Polsinelli, R. Materrassian, M. Vincenzini (eds.), Nitrogen Fixation, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*: pp. 105-111
- [9] BODDEY RM, OLIVEIRA OC, URQUIAGA S, REIS VM, OLIVARES FL, BALDANI VLD, DÖBEREINER J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* **174**: 195-209
- [10] BRADLEY DJ, KJELLBOM P, LAMB CJ (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of proline-rich plant cell wall proteins: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- [11] BREMNER JM (1965) Total nitrogen. Semimicro-Kjeldahl method. In: *C.A. Black (ed.), Methods of soil analysis, part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison, Wis*: pp 1195-1198
- [12] BROOKS DS, GONZALES CF, APPEL DN (1988) Isolation and evaluation of endophytic bacteria from live oaks for in vitro inhibition to *Ceratocystis fagacearum* and colonization of oak trees. (abstract) *Phytopathol* **78**: 626
- [13] BUSH DS (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol.* **103**: 7-13
- [14] CABALLERO-MELLADO J, FUENTES-RAMIREZ LE, REIS VM, MARTINEZ-ROMERO E (1995) Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3008-3013
- [15] CABALLERO-MELLADO J, MARTINEZ-ROMERO E (1994) Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1532-1537

- [16] CABALLERO-MELLADO J, MARTINEZ-ROMERO E, ESTRADA DE LOS SANTOS P, FUENTES-RAMIREZ LE (1997) Endophytic colonization of maize by *Acetobacter diazotrophicus*. *11ème Congrès International de Fixation de l'Azote*
- [17] CAVALCANTE VA, DÖBEREINER J (1988) A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* **108**: 23-31
- [18] CHEE RP, SCHULTHEIS JR, CANTLIFFE DJ (1991) Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Biotechnol.-agriculture* **19**: 107-117
- [19] COJHO EH, REIS VM, SCHENBERG AC, DÖBEREINER J (1993) Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 341-346
- [20] COSTACURA A, VANDERLEYDEN J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol* **21**: 1-18
- [21] DARVILL AG and ALBERSHEIM P (1984) Phytoalexins and their elicitor-defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275
- [22] DELGALLO M, FABBRI P, MARINI F, DÖBEREINER J (1991) First results of inoculation of sugar beet (*Beta vulgaris*) with *Acetobacter diazotrophicus* via V.A.mycorrhiza. (abstract) In "6th Internation Symposium on Microbial Ecology", Barcelona, 6-11 September 1992: pp 168
- [23] DIFIORE S, FABBRI P, MARINI F, DELGALLO M, BOZZINI A (1994) Tripartite interaction between *Zea mays*, *Glomus* spp and nitrogen-fixing bacteria introduced in plant rhizosphere via mycorrhiza. *Abstract book of the NATO Advanced research Workshop on Azospirillum and Related Microorganisms. Sárvár, September 4-7, 1994*
- [24] DIXON RA, HARRISON MJ, LAMB CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 479-501
- [25] DÖBEREINER J, REIS VM, LAZARINI AC (1988a) New N<sub>2</sub>-fixing bacteria in association with cereals and sugar cane. In "Nitrogen Fixation: hundred years after. Bothe H, DeBruijn FJ, Newton WE (eds) Stuttgart: Gustav Fischer: pp 717-722
- [26] DÖBEREINER J (1988b) Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* **110**: 207-212
- [27] DÖBEREINER J, REIS VM, PAULA MA, OLIVARES F (1993) Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In "New Horizons in Nitrogen Fixation" Palacios R et al. (eds). Kluwer Academic Publisher London
- [28] DONG Z, CANNY MJ, MCCULLY ME, ROBOREDO MR, CABADILLA CF, ORTEGA E, RODES R (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiol.* **105**: 1139-1147
- [29] DONG Z, HEYDRICH M, BERNARD K, MCCULLY ME (1995) Further evidence that the N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular space of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1843-1846
- [30] EBEL J and COSIO EG (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**: 1-36
- [31] EGENER T, HUREK T, REINHOLD-HUREK B (1997) Expression of the nifHDK operon of *Azoarcus* sp. BH72: Evidence for endophytic nitrogen fixation? *11ème Congrès International de Fixation de l'Azote*
- [32] FELIX G, GROSSKOPF DG, REGENASS M, BOLLER T (1991) Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8831-8834

- [33] FELIX G, REGENASS M, BOLLER T (1992) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* **4**: 307-316
- [34] FISCHER PJ, PETRINI O, LAPPIN SCOTT HM (1992) The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays*). *New Phytol* **122**: 299-305
- [35] FRITSCHKE C (1990) Modelluntersuchungen im Gradostaten zum Einfluß von C-, O<sub>2</sub>- und N-Gradienten auf diazotrophe Mikroorganismen und Mischkulturen aus der Rhizosphäre von Reis (*Oryza Sativa* L.). *Dissertation Inst Biophysik, Universität Hannover*
- [36] FRITSCHKE C, NIEMANN EG (1990) Nitrogen fixation in continuous culture with Ammoniumchlorid-containing media. *Appl Env Microbiol* **56**: 1160-1161
- [37] FRITSCHKE C, HUCKFELDT K, NIEMANN EG (1991a) Ecophysiology of associative nitrogen fixation in a rhizosphere model in pure and mixed culture. *FEMS Microb Ecol* **1991**: 279-292
- [38] FRITSCHKE C, UECKERT J, NIEMANN EG (1991b) Growth parameters of microaerobic diazotrophic rhizobacteria determined in continuous culture. In "Nitrogen Fixation" Polsinelli R (ed). *Kluwer Academic Publisher London*
- [39] FUENTES-RAMIREZ LE, JIMENEZ-SALGADO T, ABARCA-OCAMPO IR, CABALLERO-MELLANO J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant Soil* **154**: 145-150
- [40] GRACIA E, CHERUBINI V (1995) Formation of somatic embryos and plant regeneration from sweet potato (*Ipomoea batatas* poir.) explants. *Acta Cientifica Venezolana* **46**: 51-56
- [41] GILLIS M, KERSTERS K, HOSTE B, JANSSENS D, KROPPESTEDT RM, STEPHAN MP, TEIXEIRA KRS, DÖBEREINER J, DELEY J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen-fixing bacteria associated with sugar cane. *Int J System Bacteriol* **39**: 361-364
- [42] GOA (1953) In: Bergersen FJ, *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*, Wiley and Sons, p 84
- [43] HARDY RWF, BURNS RC, HOLSTEN RD (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem* **5**: 47-81
- [44] HELLER R (1953) *Am Sci Nat Bot Biol Veg 11<sup>th</sup> Ser*, **14**, 1
- [45] HELPER PK and WAYNE RO (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397-439
- [46] HUREK T, REINHOLD B, NIEMANN EG (1987) Effect of oxygen on ammonia-grown continuous cultures of *Azospirillum* spp. and diazotrophic rods closely associated with Kallar grass. *Can J Microbiol* **33**: 919-922
- [47] ISOPI R, FABBRI P, DELGALLO M, PUPPI G (1995) Dual inoculation of Sorghum bicolor (L.) Moench. ssp bicolor with Vesicular Arbuscular Mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*
- [48] JACOBS MJ, BUGBEE WM, GABRIELSON DA (1985) Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can J Bot* **63**: 1262-1265

- [49] JAMES EK, REIS VM, OLIVARES FL, BALDANI JI, DÖBEREINER J (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* **45**(275): 757-766
- [50] JAMES EK, OLIVARES FL (1997) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* **17**: 77-119
- [51] JANNASCH HW (1969) Estimation of bacterial growth in natural water. *J Bacteriol* **99**: 156-160
- [52] JIMENEZ-SALGADO T, FUENTES-RAMIREZ LE, TAPIA-HERNANDEZ A, MASCARUA-ESPARZA MA, MARTINEZ-ROMERO E, CABALLERO-MELLADO J (1994) *Coffea arabica* L., a New Host Plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and Isolation of Other Nitrogen-Fixing Acetobacteria. *Appl Env Microbiol* **63**: 3676-3683
- [53] KALIPPKE K (1996) Interaktionen endophytischer Bakterien im Modellsystem Multipler Chemostat. *Diplomarbeit Inst Biophysik, Universität Hannover*
- [54] KLOEPPER JW, BEAUCHAMP CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol* **38**: 1219-1232
- [55] KLOEPPER JW, RODRIGUEZ-KÁBANA R, MCINROY JA, COLLINS DJ (1991) Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant Soil* **136**: 95-102
- [56] KLOEPPER JW, SCHIPPERS B, BAKKER PAHM (1992) Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathol* **82**: 726-727
- [57] KLOEPPER JW, SCHROTH MN (1981a) Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathol* **71**: 1020-1024
- [58] KLOEPPER JW, SCHROTH MN (1981b) Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathol* **71**: 642-644
- [59] KLOSS M, IWANNEK KH, FENDRIK I (1983) Physiological properties of *Azospirillum brasilense* Sp7 in a malat limited chemostat. *J Gen Appl Microbiol* **29**: 447-457
- [60] KLOSS M, IWANNEK KH, FENDRIK I, NIEMANN EG (1986) Enrichment of diazotrophic bacteria from rice soil in continuous culture. *Plant Soil* **90**: 151-164
- [61] KOMBRINK E, SOMSSICH IE (1995) Defense responses of plants to pathogenes. *Adv Botanical Research* **21**: 1-34
- [62] KWAK SS, KIM SK, LEE MS, JUNG KH, PARK IH, LIU JR (1995) Acidic peroxidases from senspension-cultures of sweet potato in suspension culture. *Phytochemistry* **39** (5): 981-984
- [63] KWAK SS, KIM SK, PARK IH, LIU JR (1996) Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry* **43** (3): 565-568
- [64] LEGENDRE L, RUETER S, HEINSTEIN PF, LOW PS (1993) Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* **102**: 233-240
- [65] LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- [66] LI R, MACRAE IC (1991) Specific association of diazotrophic Acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry* **23**: 999-1002

- [67] LOCASCIO SJ, DANGLER JM (1986) Starch and mineral nutrient accumulation by sweet potato cultivars. In: V.H. Smith (Editor) *Biomass energy development*. Plenum Press, New York: pp 197-205
- [68] MATHIEU Y, KURKDJIAN A, XIA H, GUERN J, KOLLER A (1991) Membran responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J* 1: 333-343
- [69] MCINROY JA, KLOEPPER JW (1991) Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. In "*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Progress and Prospects*" Keel C, Koller B, Défago G (eds): pp 328-331
- [70] MCINROY JA, KLOEPPER JW (1994) Novel bacterial taxa inhabiting internal tissues of sweet corn and cotton. In "*Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*" Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds). CSIRO, Australia: pp 190
- [71] MEHEDEY MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* 105: 467-772
- [72] MISAGHI IJ, DONNDELINGER CR (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathol* 80: 808-811
- [73] MONOD J (1949) The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol* 3: 371-394
- [74] MURASHIGE T, SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497
- [75] NEWTON JW, WILSON PW, BURRIS RH (1953) Direct determination of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation in *Azotobacter*. *J Biol Chem* 204: 445
- [76] NIEHAUS K, KAPP D, PÜHLER A (1993) Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I) deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190: 415-425
- [77] NGEZAHAYO A, KOLB HA (1993) Gap junctional conductance tunes phase difference of cholecystokinin evoked calcium oscillations in pairs of pancreatic acinar cells. *Pflügers Arch* 422: 413-415
- [78] NOZUE M, KUBO H, NISHIMURA M, YOSUDA H (1995) Detection and characterisation of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin-producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant and Cell Physiol*. 36 (5): 883-889
- [79] NÜRNBERGER T, NENNSTIEL D, JABS T, SACKS WR, HAHLBROCK K, SCHEEL D (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defenses responses. *Cell* 78: 449-460
- [80] OLIVARES FL, BALDANI VL, REIS VM, BALDANI JI, DÖBEREINER J (1993) Contribuicao para diferenciacao taxonomica entre *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubisubalbicans* in *Pseudomonas rubisubalbicans*. *Fitopatologia Brasileira* 18: 313. Suplemento No 291
- [81] PAULA MA, REIS VM, DÖBEREINER J (1991) Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol Fertil Soils* 11: 111-115
- [82] PAULA MA, URQUIAGA S, SIQUEIRA JO, DOBEREINER J (1992) Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Biol. Fertil. Soils* 14: 61-66

- [83] PEIRCE LC (1987) Sweet Potato. In: *Tuber and Tuberous Rooted Crop*, John Wiley, New York: pp 300-308
- [84] PENG M and KUC J (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disk. *Phytopathology* **82**: 696-699
- [85] REINHOLD B, HUREK T (1989) Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the kallar grass association. In "Skinner F.A., et al." Kluwer Academic Publishers Amsterdam
- [86] REINHOLD-HUREK B, HUREK T, GILLIS M, HOSTE B, VANCANNEYT M, KERSTERS K, DELEY J (1993) Azoarcus gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 574-588
- [87] REIS VM, OLIVARES F, DÖBEREINER J (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J of Appl Microbio and Biotech* **10**: 401-405
- [88] SANDERS D, BROSNAN JM, MUIR SR, ALLEN GJ, CROFTS A, JOHANNES E (1994) Ion channels and calcium signaling in plants: multiple pathways and cross-talk. *Biochem. Soc. Symp.* **60**: 183-197
- [89] SCHEEL D and PARKER JE (1990) Elicitor recognition and signal transduction and plant defense gene activation. *Z. Naturforsch.* **45**: 569-575
- [90] SCHROTH MN, WEINHOLD AR (1986) Root-colonizing bacteria and plant health. *Hort Science* **21**: 1295-1298
- [91] SCHULZE S (1999) Wachstumsphysiologische Untersuchungen am diazotrophen Endophyten *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *Diplomarbeit Inst Biophysik, Universität Hannover*
- [92] SEVILLA M, LEE S, BROCKSCHNEIDER D, DE OLIVEIRA A, BALDANI JI, KENNEDY C (1997) Studies on *Acetobacter diazotrophicus*: analysis of *nif* and related genes and contributions to sugarcane nutrition. In *11<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. Abstract L130*
- [93] SPRENT JI, DE FARIA SM (1988) Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil* **110**: 157-165
- [94] STEIN T, HAYEN-SCHNEG N, FENDRIK I (1997) Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. *Soil Biol Biochem* **29**: 969-971
- [95] STEPHAN MP, OLIVEIRA M, TEIXERA KRS, MARTINEZ-DRETS G, DÖBEREINER J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 67-72
- [96] SUMNER ME (1990) Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Adv Soil Sci* **12**: 53-123
- [97] TABACCHIONI S, BEVIVINO AM, CHIARINI L, VISCA P, DELGALLO M (1993) Characteristics of two rhizosphere isolates of *Pseudomonas cepacia* and their plant-growth promoting activity. *Microb Releases* **2**: 161-168
- [98] TEIXERA KRS, STEPHAN MP, DÖBEREINER J (1987) Physiological studies of *Saccharobacter nitrocaptans* a new acid tolerant N<sub>2</sub>-fixing bacterium. In: *Poster presented at 4<sup>th</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes, Rio de Janeiro, Final program abstracts*: p 149

- [99] TENHAKEN R, LEVINE A, BRISSON LF, DIXON RA, LAMB C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4315-4320
- [100] UECKERT J, DÖBEREINER J, FENDRIK I, NIEMANN EG (1991) Nitrate reductase activity of *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp245 V- and C-forms in continuous culture. In "Nitrogen Fixation" Polsonalli M et al (eds) Kluwer Academic Publisher London: pp 249-253
- [101] URQUIAGA S, BOTTEON PBL, BODDEY RM (1989) Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using <sup>15</sup>N-labelled soil. *Plant Soil* **110**: 311-319
- [102] URQUIAGA S, CRUZ KHS, BODDEY RM (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of America Journal* **56**: 105-114
- [103] WAGNER AM, WAGNER MJ (1995) Measurement of in vivo ubiquinone reduction levels in plant cells. *Plant Physiol.* **108** (1): 277-283
- [104] ZHENG Q, DESSAI AP, PRAKASH CS (1996) Rapid and repetitive plant regeneration in sweet potato via somatic embryogenesis. *Plant cell reports* **15** (6): 381-385

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte

Airflow-Bank	Type 324H, Fa. Ceag Schirp Reinraumtechnik, Selm-Birk
Analysenwaage	Sartorius research R300S, Fa. Sartorius, Göttingen
Autoklav	Schnellsterilier Autoklav Type 26, Fa. Melag
Autoklav	Varioklav 500 Dampfsterilisator, H + P Labortechnik GmbH, München
Brutschrank	BvW40, Fa. Memmert, Schwabach
Eppendorf-Mischer	Type 5432, Eppendorf-Gerätebau Netheler+Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf-Thermostat	Type 5320, Eppendorf-Gerätebau Netheler+Hinz GmbH, Hamburg
Gaschromatograph	Fractovap mod. 4200-01, Carlo Erba Strumentazione, Italien
Magnetrührer	IKA Combimag RCT, Ika Werk, Staufen i. Breisgau
Mikroskop	Fa. Zeiss, Oberkochen
Millipore-Anlage	Milli-Q Plus, FA. Millipore, Eschborn
Mikrowaage	Sartorius micro M3P-00V001, Fa. Sartorius, Göttingen
Mono-Mixer	Sarstedt
Multipler Chemostat	Eigenkonstruktion, Institut für Biophysik, Uni-Hannover
Osmometer	Vapor Pressure Osmometer 5500, Wescor
pH-Elektroden	Fa. Ingold, Urdorf
pH-Meter	Präzisions-pH-Meter Typ 350, Fa. Knick, Berlin
Sauerstoff-Elektroden	Clark-Elektrode, Fa. Ingold, Urdorf
Schüttelwasserbad	Type 1083, reziprok, Fa. GLF (Gesellschaft für Labortechnik), Burgwedel
Sterilbank	NSF 49 BS 5726, Biohazard, Fa. Clean Air, Woerden, NL
Spektralphotometer	Spectronic 301, Fa. Milton Roy, USA
Tischwaage	Sartorius laboratory L2200p, Fa. Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge	Fa. Kleinfeld GmbH Labortechnik, Hannover
Zentrifuge	Centrifuge Model J2-21, Fa. Beckmann Instruments, München

## 7.2 Lebenslauf

<b>Name</b>		Kai-Olaf Kalippke
<b>Anschrift</b>		Theodor Krüger Str 10 30167 Hannover Tel.: 0511/13784 e-mail: kalippke@gmx.de
<b>Geburtsdatum/ -ort</b>		24.06.1967 in Soltau
<b>Nationalität</b>		deutsch
<b>Familienstand</b>		ledig
<b>Schulbildung</b>	1973-1977	Grundschule Breloh
	1977-1987	Gymnasium Soltau
<b>Schulabschluß</b>	05/87	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
<b>Wehrdienst</b>	07/87-07/89	in Munster (Heer)
<b>Studium</b>	10/89-12/96	Studiengang Biologie an der Universität Hannover
	04/95	Diplomprüfung (Note: sehr gut)
<b>Diplomarbeit</b>	06/95-12/96	Interaktion endophytischer Bakterien im Modellsystem Multipler Chemostat. Institut für Biophysik, Universität Hannover (Note: sehr gut)
<b>Promotion</b>	01/97-06/00	Interaktion endophytischer Bakterien mit ihren Wirtspflanzen auf zellulärer Ebene im Multiplen Chemostaten. Institut für Biophysik, Universität Hannover
<b>Stipendium</b>	07/97-06/99	Stipendium nach dem Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses (GradFöG) an der Universität Hannover

<b>Berufserfahrung</b>	04/96-01/97	Studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik, Universität Hannover zur Betreuung von Praktika im Hauptstudium
	01/97-07/97	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysik, Universität Hannover
	07/97-06/99	Studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik, Universität Hannover zur Betreuung von Praktika im Hauptstudium
	seit 07/99	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biophysik, Universität Hannover
<b>Forschungsaufenthalte</b>	06/95	4 Wochen am ENEA, Casaccia, Rom im Rahmen eines EU-Projektes
	07/96-08/96	4 Wochen am ENEA, Casaccia, Rom im Rahmen eines EU-Projektes
	11/96	2 Wochen am ENEA, Casaccia, Rom im Rahmen eines EU-Projektes
	03/98-05/98	9 Wochen am EMBRAPA/CNPAB, Rio de Janeiro im Rahmen einer bilateralen Kooperation
<b>Sprachkenntnisse</b>		Englisch
		Grundkenntnisse in Italienisch
		Grundkenntnisse in Portugiesisch
<b>EDV Kenntnisse</b>		MS-Office 97 (spez. Word und Excel)
		Origin, SigmaPlot, CorelDraw
		Grundkenntnisse in Pascal
<b>Zusatzqualifikationen</b>	10/89	C-Schiedsrichterlizenz Basketball
	08/92	C-Trainerlizenz und Fachübungsleiter für den Jugend- und Seniorenbereich Basketball
	04/96	Rückenschulleiterlizenz
	seit 01/97	Abteilungsleiter Basketball