

**Molekulare Grundlagen
der Pflanze-Mikroorganismus-Interaktion
am Beispiel der Assoziation
mit *Azospirillum brasilense***

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

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

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Sandra Schulze-Stanke
geboren am 18. Dezember 1968 in Hannover

2003

Referent: Prof. Dr. István Fendrik, Hannover
Korreferent: PD Dr. Irene Marten, Würzburg

Tag der Promotion: 5. Februar 2003

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen Pflanzen und wachstumsfördernden Bakterien auf makroskopischer und molekularer Ebene untersucht. Als Modellpflanze wurde *Arabidopsis thaliana* gewählt, von der neben dem Wildtyp auch diverse Verlust-Mutanten des Kalium- und Auxintransports zur Verfügung standen. Auf Seiten der Bakterien wurden verschiedene Stämme von *Azospirillum brasilense* eingesetzt, die sich in der Syntheseleistung des Phytoeffektors Indol-3-Essigsäure (IAA) unterschieden.

Mit Hilfe des GUS- bzw. GFP-Reportersystems konnte zunächst gezeigt werden, daß *Azospirillum brasilense* die Wurzel von *Arabidopsis thaliana* dauerhaft besiedelt. Dabei kolonisierten die Bakterien bevorzugt die Ausbruchstellen der Seitenwurzeln und die Wurzelhaare. Die *Azospirillum*-Besiedlung resultierte in einer Förderung des Pflanzenwachstums. Beobachtet wurden längere und dickere Wurzeln, eine höhere Anzahl an Seitenwurzeln, ein dichterer Wurzelhaarbesatz, eine Kräftigung des Sprosses sowie eine insgesamt erhöhte Trockenmasse. Die Ausprägung der Effekte auf die Pflanzenwurzel hing unmittelbar mit der bakteriell produzierten Menge an IAA zusammen. Mit steigender Syntheseleistung zeigte sich eine zunehmende Stauchung des Wurzelsystems, die allerdings mit einer Verdichtung des Wurzelhaarbesatzes einherging. Der Einsatz pflanzlicher GUS-Reportersysteme belegte, daß nach Inokulation mit *Azospirillum* der Gehalt an Auxin in der Wurzel anstieg, und zugleich der Auxin-Influx-Carrier AUX1 in der *Arabidopsis*-Wurzel vermehrt auftrat. Dabei stimmten die Orte der Azospirillen-Kolonisierung mit dem Auftreten von Auxin- bzw. AUX1 in der Wurzel überein.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß wurzelassoziierte Azospirillen Stickstoff fixieren. Eine Behandlung der Pflanzen mit Ammonium, dem Endprodukt der Stickstofffixierung, konnte jedoch keine Wachstumsförderung auslösen. Allerdings gelang es mit Hilfe des synthetischen IAA-Analogs 1-NAA, die durch Azospirillen verursachte Wurzelproliferation in sterilen Pflanzenkulturen annähernd zu imitieren. Eine Verstärkung des Sproßwachstums konnte durch den Phytoeffektor Gibberellinsäure erreicht werden, der ebenfalls zu den Ausscheidungsprodukten von Azospirillen gehört.

Bei der Untersuchung des Expressionsverhaltens verschiedener in der *Arabidopsis*-Wurzel lokalisierter, K^+ -selektiver Ionenkanäle zeigte sich für den K^+ -Kanal SKOR eine signifikante Veränderung der Transkription in Gegenwart der Azospirillen. Die mRNA-Expression dieses für die K^+ -Abgabe an das Xylem verantwortlichen Kanals wurde im Zuge der Assoziation reprimiert. Dagegen zeigten sich die für die K^+ -Aufnahme aus dem Boden verantwortlichen Kanäle AtKC1 und AKT1 in ihrer Expression unverändert. Da eine Repression von SKOR auch durch eine Behandlung der Pflanze mit 1-NAA erreicht werden konnte, ist anzunehmen, daß auch die durch Azospirillen verursachte Regulation des K^+ -Kanals auf bakteriell produziertes Auxin zurückzuführen ist.

Stichwörter: K^+ -Kanäle, *Azospirillum brasilense*, *Arabidopsis thaliana*

Abstract

Within the scope of this thesis the interaction between plants and plant growth promoting bacteria was analyzed both on macroscopic and molecular level. As a model plant the common wall cress (*Arabidopsis thaliana*) was chosen. Apart from the wild type, various knock out mutants of potassium (K^+) and auxin transport were available. On the bacterial side several strains of *Azospirillum brasilense* were used, differing in their output of the plant growth effector indole-3-acetic acid (IAA).

Using GUS- and GFP reporter systems, respectively, it could be demonstrated that *Azospirillum brasilense* is able to permanently colonize the root system of *Arabidopsis thaliana*. Preferably, bacteria were found at the sites of lateral root emergence as well as on root hairs. Inoculated plants were subject to a visible growth promotion when compared to non-inoculated plant cultures. This promotion was reflected by longer and thicker roots, a growing number of lateral roots and an increased density of root hairs. At the same time, the dry matter of root and shoot was increased several times. The extent of the morphological effects was directly correlated with the amount of auxins synthesized by the used *Azospirillum* strains. In this context, an increased bacterial auxin excretion certainly resulted in a less pronounced root growth but was accompanied by a growing root hair density. By using GUS expressing mutants of *Arabidopsis thaliana*, it could be demonstrated that during incubation the auxin content and the amount of auxin influx carrier AUX1 went up, as well. In this context, sites of root colonization corresponded to sites of accumulated auxin and expressed influx carriers, respectively. Furthermore, biological nitrogen fixation was shown to occur during incubation of *Arabidopsis* plants with *A. brasilense*. Treating plants with ammonium, however, did not cause any plant growth promotion. On the other hand, supplying plants with the synthetic auxin 1-NAA resulted in a phenotype most similar to inoculated plants. An enhanced shoot growth could be achieved by using the plant growth effector gibberellic acid, which is likewise excreted by *A. brasilense*.

The expression pattern of different K^+ selective ion channels in the root of *Arabidopsis thaliana* revealed that the transcription level of SKOR was significantly changed during incubation with *Azospirillum brasilense*. SKOR, responsible for the translocation of K^+ ions to the shoot, was strongly repressed in the presence of *Azospirillum*. In contrast, K^+ channels AtKC1 and AKT1, responsible for the uptake of K^+ ions from the soil, showed no significant change of their expression pattern when plants were associated with *Azospirillum*. Since a similar fast repression could be obtained by treating plants with 1-NAA, it is assumed that the expression pattern of SKOR in inoculated plants is caused by auxins, excreted by *Azospirillum*.

Key words: K^+ channels, *Azospirillum brasilense*, *Arabidopsis thaliana*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Rhizosphäre	2
1.2 Die Gattung <i>Azospirillum</i>	2
1.2.1 Kolonisierung der Pflanzenwurzel	4
1.2.2 Biologische Stickstofffixierung	5
1.2.3 Phytoeffektorproduktion	6
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.3.1 Die Aufnahme von Ionen in die Pflanze	8
1.3.2 Bedeutung und Aufnahme von Kalium	9
1.4 Phytoeffektoren und ihre Wirkungen	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Pflanzen, Bakterien und Plasmide	15
2.1.1 Pflanzen	15
2.1.2 Bakterien	15
2.1.3 Plasmide	16
2.2 Kulturmedien	16
2.3 Lösungen für die Molekularbiologie	18
2.4 Methoden	20
2.4.1 Pflanzenanzucht	20
2.4.1.1 Samensterilisierung	20
2.4.1.2 <i>Arabidopsis-thaliana</i> -Kultivierung für Morphologie- und GUS-Untersuchungen	21
2.4.1.3 Bestimmung der Trockengewichte	22
2.4.1.4 Pflanzenanzucht für molekularbiologische Versuche	22
2.4.1.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Schüttelkulturen	23
2.4.2 Mikrobiologische Methoden	24
2.4.2.1 Bakterienanzucht	24
2.4.2.2 Aufbereiten der Bakterien für die Experimente	24
2.4.2.3 Bakterienstammhaltung	24
2.4.2.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen	24
2.4.2.5 Konjugation von <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	25
2.4.3 Isolierung der Gesamt-RNA	26

2.4.4	Northern-Blot-Analyse.....	26
2.4.4.1	RNA-Gelelektrophorese.....	26
2.4.4.2	Northern-Blot.....	27
2.4.4.3	Radioaktive Markierung der AtKC1-Sonde.....	28
2.4.4.4	Hybridisierung.....	29
2.4.4.5	Autoradiografie mit dem Phosphoimager.....	29
2.4.5	Expressionsanalyse mit dem LightCycler-System.....	30
2.4.5.1	Isolierung von mRNA.....	30
2.4.5.2	Reverse Transkription.....	31
2.4.5.3	Vorbereitung der cDNA-Proben für den LightCycler.....	31
2.4.5.4	PCR-Bedingungen.....	32
2.4.5.5	Schmelzkurve.....	32
2.4.5.6	Auswertung der Meßdaten (Quantifizierung).....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Exsudatuntersuchungen.....	34
3.2	Kolonisierung der <i>Arabidopsis-thaliana</i> -Wurzel durch <i>Azospirillum brasilense spec.</i>	35
3.2.1	Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens mit Hilfe des GUS-Reportersystems.....	35
3.2.2	Kolonisierungsnachweis mit dem GFP-Reportersystem.....	36
3.3	Morphologie von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Inkubation mit <i>Azospirillum brasilense spec.</i>	37
3.3.1	Inokulation von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wildtyp).....	37
3.3.2	Inokulation der <i>Arabidopsis thaliana</i> AtKC1-k.o.-Mutante.....	39
3.3.3	Inokulation der <i>Arabidopsis thaliana</i> SKOR-k.o.-Mutante.....	39
3.3.4	Inokulation der <i>Arabidopsis thaliana</i> AUX1-k.o.-Mutante.....	39
3.3.5	Wurzelhaarbesatz von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Inkubation mit <i>Azospirillum brasilense spec.</i>	40
3.3.6	Trockengewichte von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wildtyp) nach Inokulation	42
3.3.7	Ko-Inokulation des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyps mit <i>A. brasilense spec.</i> und dem Phytopathogen <i>Ralstonia solanacearum</i>	43
3.4	Morphologieversuche mit potentiellen bakteriellen Ausscheidungsprodukten.	44
3.4.1	Nachweis der Stickstofffixierung durch wurzelassoziierte Azospirillen ...	45
3.4.2	Morphologie von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Gegenwart von Ammonium (NH ₄ ⁺).....	46
3.4.3	Einfluß von Gibberellinsäure (GA ₃) auf die Morphologie.....	46
3.4.4	Behandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit 1-Naphtylessigsäure (1-NAA).....	47
3.4.4.1	Morphologie von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Behandlung mit 1-NAA.....	48

3.4.4.2	Morphologie von <i>Arabidopsis thaliana</i> AtKC1-k.o., SKOR-k.o. und AUX1-k.o. nach Behandlung mit 1-NAA	49
3.5	Auxingehalt und -transporter in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
3.5.1	Veränderung des IAA-Gehalts in der <i>Arabidopsis</i> -Wurzel nach Inkubation mit <i>Azospirillum brasilense</i> spec.	51
3.5.2	Lokalisation der Expression eines Auxin-Transporters in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Inokulation mit <i>Azospirillum brasilense</i> spec.	53
3.6	Expressionsanalysen	54
3.6.1	Nachweis der <i>atkc1</i> -Expression mit Hilfe des GUS-Reportersystems ...	55
3.6.2	Northern-Blot-Analyse der <i>atkc1</i> -Expression	56
3.6.3	Expressionsanalysen mit dem LightCycler-System.....	57
3.6.3.1	Expression verschiedener K ⁺ -Kanäle in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Inkubation mit <i>Azospirillum brasilense</i> spec.	57
3.6.3.2	Expression von K ⁺ -Kanälen in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Behandlung mit 1-NAA.....	59
4	Diskussion	62
4.1	Kolonisierung und Aufbau der Assoziation zwischen <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Azospirillum</i> spec.	62
4.2	Morphologieveränderungen	63
4.2.1	Veränderung der <i>Arabidopsis</i> -Morphologie nach einer Inokulation mit Azospirillen.....	63
4.2.2	Imitierung der bakteriell verursachten Morphologieveränderungen	66
4.3	Veränderung des Auxingehalts in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach Inokulation mit <i>Azospirillum</i> spec.	69
4.4	Expression von K ⁺ -Kanälen in der Wurzel von <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
4.5	Ausblick.....	76
5	Literatur	77
6	Anhang.....	93
Erklärung		93
Danksagung.....		94
Lebenslauf.....		95

Abkürzungen

[α -P ³²]dCTP	Cytosin-triphosphat (Nucleotid) mit P ³² markiert
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
A	Adenin, Base der Nukleinsäuren
ABA	<i>abscisic acid</i> , Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
<i>A. bras.</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
AGI	<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative
AKT1; AKT2/3	<i>Arabidopsis</i> <u>K</u> ⁺ <u>T</u> ransporter
Ap ^R	Ampicillin-Resistenz
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
AtKC1, <i>atkc1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel
AuxRE	<i>auxine responsive elements</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum-Albumin
C	Cytosin, Base der Nukleinsäuren
Ca ²⁺	Kalzium (-Ion)
cDNA	komplementäre DNA
cfu	<i>colony forming units</i>
C/N-Verhältnis	Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis
Col-0	Columbia
d	day, Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> (doppelsträngige DNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Fa.	Firma
F _{Act}	Aktin-Faktor
fg	Femtogramm
G	Guanin, Base der Nukleinsäuren
GA ₃	Gibberellinsäure
GFP, <i>gfp</i>	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GORK	<u>G</u> uard cell <u>o</u> utward <u>r</u> ectifying <u>K</u> ⁺ <u>c</u> hannel
GUS, <i>gusA</i>	β-D-Glucoronidase
h	<i>hour</i> , Stunde
ha	Hektar
IAA	<i>indole acetic acid</i> , Indollessigsäure
i. d. R.	in der Regel
<i>ipdc</i>	Indol-3-Pyruvat-Decarboxylase
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz

KAT1	K^+ channel <i>Arabidopsis thaliana</i>
kb	Kilobasenpaare
KCO1 bzw. KCO5	K^+ channel outward rectifying 1 bzw. 5
k.o.	knock out
LB	Luria Bertani
M	molar
MBq	Megabequerel
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N	nitrogen, Stickstoff
1-NAA	naphtalene acetic acid, 1-Naphtylelessigsäure
Neo ^r	Neomycin-Resistenz
NFb	Novo Fabio
nifH	Stukturgen der Nitrogenase
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei 578 nm
o. g.	oben genannt
p ³²	radioaktives Isotop von Phosphor
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease (RNA abbauende Enzyme)
PP	Probenpuffer
RT	Reverse Transkription
SKOR	Stelar K^+ outward rectifier
s. o.	siehe oben
spec.	species
s. u.	siehe unten
T	Thymin, Base der Nukleinsäuren
Tc ^r	Tetracyclin-Resistenz
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Amino-Methan
U	Units, Einheit für Enzymaktivitäten
UpM	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
WS	Wassilewskija
WT	Wildtyp
X-GlcA	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucoronsäure
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar

1 Einleitung

Die Weltbevölkerung wird nach Schätzungen der Vereinten Nationen in den nächsten 20 Jahren von etwa sechs auf acht Milliarden Menschen anwachsen. Infolgedessen wird sich ein Mehrbedarf an Nahrungsmitteln ergeben, der sich nur durch erhebliche Ertragssteigerungen in der Landwirtschaft decken läßt (Trewavas, 2001). Ein Produktionszuwachs ist jedoch in der überwiegend auf Monokultur ausgerichteten Landwirtschaft gegenwärtig nur durch den intensiven Einsatz von Pflanzenschutz-, Schädlingsbekämpfung- und Düngemitteln möglich. Abgesehen von den hohen Kosten, die damit verbunden sind, hat dieses Vorgehen schwerwiegende Folgen für die Umwelt. In diesem Zusammenhang sei nur die starke Grundwasserbelastung durch stickstoffhaltigen Dünger oder das Aufkommen von resistenten Schädlingsarten genannt (Quispel, 1991). Die Entwicklung neuer Kultivierungsstrategien wird daher in Zukunft zu den größten Herausforderungen im landwirtschaftlichen Bereich zählen.

Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung der genannten Problematik könnte sich bei Betrachtung der bereits bestehenden und im Laufe der Evolution etablierten Symbiosen und Assoziationen zwischen Pflanzen und Bodenbakterien ergeben. Diese Lebensgemeinschaften fördern nachweislich das Wachstum bestimmter Pflanzen und tragen damit zur Ertragssteigerung bei (Bohlool *et al.*, 1992; Broughton *et al.*, 2000). Eine der bekanntesten Symbiose-Formen ist beispielsweise die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose zwischen Bakterien der Gattung *Rhizobium* und Pflanzen der Ordnung *Fabales* (Leguminosen: Erbsen, Bohnen etc.) (Peoples und Craswell, 1992). Solch eine Symbiose zeichnet sich allerdings durch eine sehr hohe Wirtsspezifität aus. Es ist daher bis heute nicht gelungen, diese für die Leguminosen sehr effiziente Form der Lebensgemeinschaft auf andere Pflanzen auszudehnen. Aufgrund der niedrigeren Wirtsspezifität sind Assoziationen mit freilebenden, nicht-symbiontischen Bakterien für die Wachstumsförderung landwirtschaftlich relevanter Pflanzen eine Alternative (Kennedy und Tchan, 1992; Okon, 1985). Allerdings sind die Vorgänge, die zum Aufbau einer Pflanzen-Bakterien-Assoziation führen, noch nicht vollständig aufgeklärt. Beispielsweise ist unklar, ob es einen Erkennungsmechanismus zwischen den Assoziationspartnern gibt, und welche Signal- und Botenstoffe darin involviert sind. Ferner ist nur wenig darüber bekannt, welche pflanzlichen und bakteriellen Gene daran beteiligt sind. Um einen gezielten Einsatz assoziativer Bakterien in der Landwirtschaft zu ermöglichen, ist es daher notwendig, die Abläufe zu verstehen, die sich bei der Etablierung einer Assoziation im unmittelbaren Bereich um die Pflanzenwurzel abspielen.

1.1 Die Rhizosphäre

Die Rhizosphäre bezeichnet den Erdbodenbereich, der durch eine Pflanzenwurzel direkt beeinflusst werden kann (Bashan, 1999; Miller und Wood, 1996). In diesem Bereich kommt eine Vielzahl von Verbindungen vor, die von Pflanzen abgegeben und als Exsudate bezeichnet werden. Dazu gehören organische Säuren, Mono- und Disaccharide, Aminosäuren, Fettsäuren und Enzyme (Benizri *et al.*, 1998; Rovira, 1969). Durch dieses erhöhte Nährstoffangebot wird die Ansiedlung von Mikroorganismen um die Pflanzenwurzel begünstigt. Neben Pilzen und Algen kommen vor allem Bakterien in der Rhizosphäre vor (Newman, 1985). Während ein Großteil dieser Bakterien an die Oberfläche von Bodenpartikeln gebunden ist, interagieren einige Gattungen mit den Wurzeln der Pflanzen. Diese Interaktionen können sowohl positive als auch negative Effekte auf das Wachstum der Pflanze ausüben (Lynch, 1986). Bakterien, die Krankheiten auslösen und somit das Pflanzenwachstum deutlich einschränken können, gehören zu den phytopathogenen Mikroorganismen. Demgegenüber steht eine Gruppe von Bakterien, die in der Lage ist, das Pflanzenwachstum positiv zu beeinflussen. Generell läßt sich diese Gruppe in symbiotische und freilebende Bakterien untergliedern (Glick, 1995). Zu den bekanntesten Vertretern der symbiotischen Bakterien gehören, wie bereits erwähnt, die Arten der Gattung *Rhizobium*. Die freilebenden Bakterien werden in der Gruppe der pflanzenwachstumsfördernden Bakterien zusammengefaßt (*plant growth promoting rhizobacteria*, PGPR) (Bashan und Levanony, 1990). Im Gegensatz zur Rhizobien-Leguminosen-Symbiose, bei der die Bakterien nach der Besiedlung in die Pflanze eindringen und es zur Ausbildung charakteristischer symbiotischer Strukturen („Knöllchen“) kommt, bleibt es bei einer Assoziation mit PGPR-Bakterien bei einer oberflächlichen Wurzelbesiedlung (Reinhold *et al.*, 1986). Als Ursachen der wachstumsfördernden Effekte von PGPR-Bakterien werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Dazu gehören Stickstofffixierung, Siderophorenbildung, Mobilisierung von anorganisch und organisch gebundenem Phosphor, Phytoeffektorbildung sowie eine allgemeine Verbesserung der Mineralstoffaufnahme (Glick, 1995; Höflich *et al.*, 1994; Lin, 1983).

1.2 Die Gattung *Azospirillum*

Typische Vertreter der PGPR sind die Bakterien der Gattung *Azospirillum*. Azospirillen sind bewegliche, gram-negative, diazotrophe Bakterien, die zur α -Unterklasse der Proteobakterien gehören (Burdman *et al.*, 2000; Martin-Didonet *et al.*, 2000). Sie kommen natürlicherweise in der Rhizosphäre und auf der Wurzeloberfläche zahlreicher Gräser (Mais, Weizen, Reis) und Nicht-Gräser (Süßkartoffel, Kakteen, Mangroven, Hornklee) vor (Mascarua-Esparza, 1988; Bashan und Levanony, 1990; Puente *et al.*, 1999; Holguin *et al.*, 2001). Die Gattung *Azospirillum* umfaßt mittler-

weile sechs Spezies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* und *A. doebereineriae* (Bashan und Vazquez, 2000; Eckert *et al.*, 2001). Von diesen Arten ist die am besten charakterisierte *Azospirillum brasilense*, die aus der Rhizosphäre des tropischen Pangola-Grases *Digitaria decumbens* in Brasilien isoliert wurde (Tarrand *et al.*, 1978). Aufgrund ihrer Lebensweise werden Azospirillen auch als fakultative Endophyten bezeichnet. Während die obligaten Endophyten (z. B. *Azoarcus* in Kallargras [Reinhold-Hurek *et al.*, 1993], *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Zuckerrohr [Cavalcante und Döbereiner, 1988]) intrazellulär in Pflanzen vorkommen und kaum im Boden überleben, besiedeln Azospirillen als fakultative Endophyten die Wurzeloberflächen und die Interzellularräume der äußeren Rindenzellen von Wurzeln (Baldani *et al.*, 1997). Ferner zeigen Azospirillen keinerlei Präferenz für eine bestimmte Bodenart und kommen in verschiedenen Temperaturzonen vor (Bashan und Holguin, 1997). Darüber hinaus gelten Azospirillen mittlerweile als allgemeine Wurzelkolonisierer, da auch Pflanzen inokuliert werden konnten, die nicht dem natürlichen Wirtsspektrum der Azospirillen angehören (Feng und Kennedy, 1997; Bashan und Holguin, 1997). Die pflanzenwachstumsfördernden Effekte der Azospirillen konnten bereits u. a. an Hirse, Weizen, Mais und der Mikroalge *Chlorella vulgaris* gezeigt werden (Boddey und Döbereiner, 1988; Gonzalez *et al.*, 2000). So wurden nach einer Inokulation Erhöhungen der Trockenmasse, höhere Keimungsraten und in fast allen Fällen Veränderungen der Wurzelmorphologie beobachtet (Bashan *et al.*, 2000). Letztere zeigten sich meist in einer Zunahme der Gesamtwurzellänge, einer erhöhten Anzahl an Seitenwurzeln sowie in einer Verdichtung und Verlängerung der Wurzelhaare (Bashan und Levanony, 1990; Dubrovsky *et al.*, 1994). Diese Effekte variierten dabei in Abhängigkeit von der Inokulationsdichte und den Kulturbedingungen (Hadas und Okon, 1987). Eine deutliche Ertragssteigerung nach Inokulation mit *Azospirillum* wurde bei Tomate (30 %), Paprika (23 %), Aubergine (18 %) und Baumwolle (16 %) festgestellt (Bashan *et al.*, 1989). Eine weitere Studie von Bashan (1998) zeigte, daß *Azospirillum*-Arten keine symptomatischen Krankheitsbilder bei diesen Pflanzen auslösten. So lag der für eine Pathogenantwort typische Phytoalexin-Gehalt nach Inokulation deutlich unterhalb der Konzentration, die ein ausgewiesenes Pflanzenpathogen induzierte. Wie bei anderen Vertretern der PGPR sind auch bei den Azospirillen die Mechanismen der Wachstumsförderung noch nicht vollständig geklärt (Holguin *et al.*, 1999). Der wachstumsfördernde Effekt auf die Pflanze wird meist auf die Stickstofffixierung und -abgabe, auf die bakterielle Produktion von Phytoeffektoren und auf eine allgemein verbesserte Mineralstoffaufnahme zurückgeführt (Bashan und Holguin, 1997). Im folgenden Abschnitt werden die Voraussetzungen erörtert, die den Aufbau einer engen Assoziation zwischen Pflanze und Bakterium fördern.

1.2.1 Kolonisierung der Pflanzenwurzel

Die Besiedlung der Pflanzenwurzel gilt als essentieller Schritt beim Aufbau einer Assoziation zwischen Azospirillen und Pflanzen (Castellanos *et al.*, 1998). Die Kolonisierung durch die Azospirillen erfolgt dabei bevorzugt in der Wurzelhaarzone, an den Wurzelhaaren selbst, in der Wurzelstreckungszone der Pflanze sowie an den Ausbruchstellen von Seitenwurzeln (Abb. 1.1; Baldani *et al.*, 1997; Vande Broek *et al.*, 1998). Die Azospirillen werden durch pflanzliche Exsudate in den Bereich der Pflanzenwurzeln gelockt. Zu den Attraktanten, die auf Azospirillen chemotaktisch wirken, gehören vor allem organische Säuren sowie Aminosäuren, Mono- und Disaccharide (Reinhold *et al.*, 1985; Bastarrachea *et al.*, 1988; Vande Broek *et al.*, 1998). Der Attraktant ist dabei stammspezifisch. Während einige *Azospirillum-brasilense*-Stämme hauptsächlich organische Säuren wie Malat und Citrat bevorzugen, wird *Azospirillum lipoferum* auch von den Aminosäuren Aspartat und Glutamat chemotaktisch beeinflusst (Reinhold *et al.*, 1985). An Weizenwurzeln konnte gezeigt werden, daß der weitere Kolonisierungsvorgang in zwei Phasen erfolgt. Die erste Phase führt zu einem lockeren Anheften („attachment“) der Azospirillen an der Wurzeloberfläche, bei dem das polare Flagellum der Bakterien involviert ist. Die zweite Phase setzt nach etwa 16 Stunden ein und zeichnet sich durch eine feste, irreversible Verankerung („anchoring“) auf der Wurzeloberfläche aus (Bashan und Holguin, 1997; Fischer *et al.*, 2000). Für diese feste Bindung sind wahrscheinlich Calcofluor-bindende Exopolysaccharide auf der Oberfläche der Bakterien verantwortlich (Vande Broek *et al.*, 1998). Die feste Verankerung an der Wurzel während der Assoziation verhindert ein Abwaschen der Bakterien durch Bodenwasser. Darüber hinaus fördert der enge Kontakt der Assoziationspartner den direkten Austausch von bakteriellen und pflanzlichen Exsudaten und vermindert deren Diffusion in den Boden (Bashan und Holguin, 1997). Die Bedeutung einer Assoziation für Bakterien der Gattung *Azospirillum* zeigt sich ebenfalls in verschiedenen Inokulations- und Re-isolierungsversuchen. Sie belegen, daß Azospirillen sich im Boden ohne Pflanzenwurzeln kaum vermehren können und deshalb Überdauerungsformen ausbilden (Castellanos *et al.*, 2000; Bashan und Vasquez, 2000).

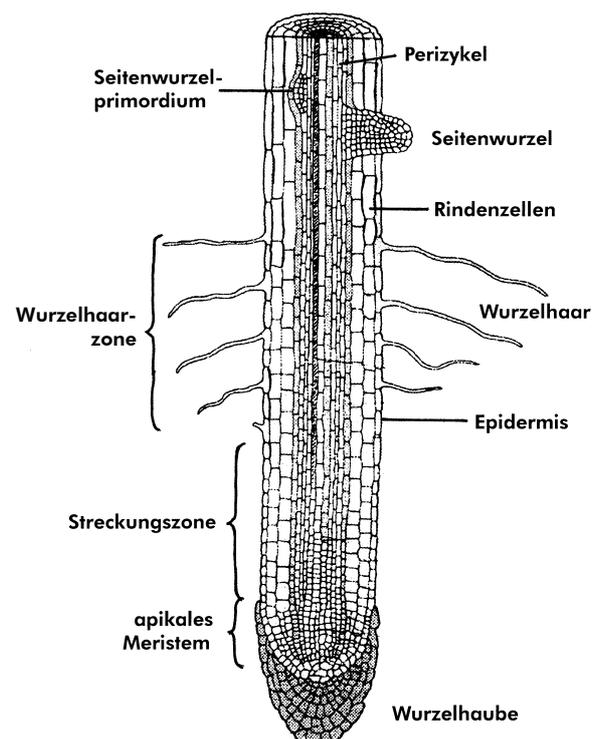


Abb. 1.1.

Schematische Darstellung einer Pflanzenwurzel. Dargestellt sind die vier Entwicklungszonen der Wurzel: das apikale Meristem, die Streckungszone, die Wurzelhaarzone und darüber der Bereich der Seitenwurzelsbildung.

(<http://www.biologie.uni-rostock.de/>, modifiziert).

1.2.2 Biologische Stickstofffixierung

Der Begriff Stickstofffixierung bezeichnet die Umsetzung von elementarem Stickstoff zu Ammoniak. Dabei wird zwischen biologischer und technischer Stickstofffixierung unterschieden (Okon und Hardy, 1983). Letztere wird zur industriellen Herstellung von stickstoffhaltigen Düngemitteln eingesetzt. Die Umsetzung des Stickstoffs zu Ammoniak erfolgt z. B. im Rahmen des Haber-Bosch-Verfahrens mit Hilfe von hohem Druck (etwa 450 bar) und Temperaturen bis 500° C. Die biologische Stickstofffixierung ist dagegen ein enzymatischer Prozeß, der durch den Enzym-Komplex Nitrogenase katalysiert wird (Eady und Postgate, 1974). Dieser kommt ausschließlich bei einer Gruppe von Prokaryonten vor, die als diazotrophe Bakterien bezeichnet werden. Sie sind mit Hilfe der Nitrogenase in der Lage, molekularen Stickstoff aus der Luft zu binden und zu Ammonium zu reduzieren (Howard und Rees, 1996). Da dieser Prozeß sehr energieintensiv ist, unterliegt sowohl die Transkription der für die Nitrogenase kodierenden Strukturgene *nifHDK* als auch die Aktivität des Enzyms einer strengen Regulation (Zhang *et al.* 1997; Rudnick *et al.*, 1996; Dixon, 1984). So wurden z.B. in *Klebsiella pneumoniae*, einer freilebenden Spezies der diazotrophen Bakterien, bislang 17 Gene gefunden, deren Syntheseprodukte an der Regulation der Stickstofffixierung beteiligt sind (Gussin *et al.*, 1986; Ausubel, 1984). Infolge dieser Regulation fixieren die Bakterien Luftstickstoff nur bei Mangel an gebundenem Stickstoff und ausreichenden Energiereserven (Hartmann *et al.*, 1986; Hartmann *et al.*, 1988; Mugnai *et al.*, 1994). Hinzu kommt, daß die Nitrogenase durch ihre extreme Sauerstoffempfindlichkeit nur bei einem Sauerstoffpartialdruck aktiv ist, der unterhalb des in der Atmosphäre herrschenden Partialdrucks liegt (Hartmann und Burris, 1987; Halbleib und Ludden, 2000). Daher haben diazotrophe Bakterien diverse Strategien entwickelt, um ihre Nitrogenase gegen Sauerstoff zu schützen. Zu diesen Schutzmechanismen gehören u. a. die Vermeidung des Sauerstoffs durch anaerobe Lebensweise sowie Schleimbildung und die Verstärkung der Zellwände, um die Sauerstoffdiffusion in die Zellen zu vermindern (Eady, 1992; Marchal und Vanderleyden, 2000). *Azospirillum*-Arten können beispielsweise nur unter mikroaeroben Bedingungen Stickstoff fixieren (Döbereiner, 1983; Zhang *et al.*, 1993). Mit Hilfe ihrer aerotaktischen Fähigkeiten sind sie jedoch in der Lage, solche Orte aktiv aufzusuchen (Barak *et al.*, 1982). In den 80er Jahren wurde die biologische Stickstofffixierung als Hauptursache für die pflanzenwachstumsfördernden Effekte durch diazotrophe Bakterien angesehen. Tatsächlich konnte zumindest für die Rhizobien-Leguminosen-Symbiose ein signifikanter Stickstoffbeitrag der Rhizobien zum Pflanzenwachstum nachgewiesen werden. Die Stickstoffeinträge der Bakterien liegen in einer Größenordnung von 100 bis 200 kg N/ha · Jahr (Bohlool *et al.*, 1992; Peoples und Craswell, 1992). Im Gegensatz dazu konnte bei freilebenden Diazotrophen, wie z. B. bei *Azospirillum brasilense*, bislang keine eindeutige Korrelation zwischen Wachstumsförderung und bakteriell fixiertem Stickstoff festgestellt werden (Zakharova *et al.*, 2000).

1.2.3 Phytoeffektorproduktion

Azospirillum-Arten produzieren und exsudieren nachweislich die Phytoeffektoren Indol-3-Essigsäure (IAA), Gibberellinsäure (GA_3 und GA_1), Cytokinin und Ethylen (Bashan und Holguin, 1997; Piccoli *et al.*, 1997; Bottini *et al.*, 1989; Costacurta *et al.*, 1994). Diese Substanzen werden ebenfalls in Pflanzen synthetisiert und dienen dort u. a. der Wachstumsregulation (vgl. Kapitel 1.4). Ihre Funktion und Bedeutung bei den Azospirillen, die diese Effektoren konstitutiv und vor allem in der stationären Wachstumsphase produzieren, ist dagegen noch nicht geklärt (El-Khawas und Adachi, 1999).

Die Gibberelline GA_1 und GA_3 wurden in 48 Stunden alten Kulturen von *Azospirillum lipoferum* nachgewiesen (Bottini *et al.*, 1989). Aber auch bei *Azospirillum brasilense* konnte die Produktion von Gibberellinen festgestellt werden (Janzen *et al.*, 1992). Des weiteren beschrieben Cassan *et al.* (2001), daß eine Mischkultur aus *Azospirillum brasilense* und *Azospirillum lipoferum* in der Lage ist, extern verabreichtes GA_{20} zu GA_1 zu hydrolysieren. Zwergwuchs-Mutanten von Reis, die mit diesem Hydrolysat behandelt wurden, zeigten danach eine Verlängerung der Blätter. Im Gegensatz zu den Gibberellinen ist die Produktion von Indol-3-Essigsäure durch *Azospirillum* ausführlicher untersucht. Azospirillen verfügen über die genetische Ausstattung, Indol-3-Essigsäure über drei verschiedene Synthesewege zu produzieren, von denen zwei die Aminosäure Tryptophan als Ausgangsstoff für die Synthese nutzen (Costacurta und Vanderleyden, 1995; Manulis *et al.*, 1998). Beim Indol-3-Pyruvat-Weg (IPyA-Weg), dem IAA-Hauptsyntheseweg der Azospirillen, wird das Tryptophan zunächst durch eine Transaminase in Indol-3-Pyruvat (IPA) umgewandelt. Danach katalysiert die Indol-Pyruvat-Decarboxylase (*ipdC*) die Reaktion von IPA zu Indol-3-Acetaldehyd, welches schließlich im letzten Schritt des IPyA-Weges durch eine Dehydrogenase zu Indol-3-Essigsäure umgesetzt wird. Der zweite Tryptophan-abhängige Syntheseweg ist der Indol-3-Acetamid-Weg (IAM-Weg), für den dritten, Tryptophan-unabhängigen Weg wurde der Ausgangsstoff noch nicht identifiziert (Prinsen *et al.*, 1993; Lambrecht *et al.*, 2000). Da das im IPyA-Weg vorkommende Enzym Indol-Pyruvat-Decarboxylase (*ipdC*) auch im Tryptophan-unabhängigen Weg aktiv ist, kommt diesem Enzym eine Schlüsselrolle bei der Phytoeffektorproduktion zu (Yagi *et al.*, 2001). Untersuchungen zeigten, daß das *ipdC*-Gen sowohl durch den Ausgangsstoff Tryptophan als auch durch exogen applizierte IAA induzierbar ist (Zimmer *et al.*, 1998; Vande Broek *et al.*, 1999). Weitere Studien belegten, daß der *ipdC*-Promotor eine Auxin-induzierbare Sequenz (AuxRe) aufweist, die Ähnlichkeit mit auxin-induzierten Sequenzen pflanzlicher Gene zeigt (Lambrecht *et al.*, 2000). Versuche, eine *Azospirillum*-Mutante zu erzeugen, die kein Auxin produzieren kann, scheiterten bislang, da es sich als problematisch erwies, alle Synthesewege auszuschalten (Carreno-Lopez *et al.*, 2000). Über Transposon-Mutagenese gelang es jedoch, das *ipdC*-Gen auszuschalten und mit dem *Azospirillum*-Stamm SpM7918 eine Mutante zu erzeugen, die nur etwa 10% des konstitutiven *Azospirillum*-Wildtyp-Levels produziert (Costacurta *et al.*, 1994). Es sind

auch IAA-Hyperproduzenten von *Azospirillum brasilense* bekannt. Bereits 1983 isolierten Hartmann *et al.* den Stamm FT326, der in Laborversuchen 10 bis 30 mal so viel IAA ausschüttete wie der Wildtyp. Dieses Verhalten ist vermutlich auf eine fehlende Feedback-Inhibition der Anthranilat-Synthetase zurückzuführen, die für die Tryptophan-Synthese verantwortlich ist. Beim Wildtyp von *Azospirillum brasilense* wirkt sich neben der Wachstumsphase auch die Gegenwart bestimmter Stoffe auf die produzierte und in das Medium abgegebene Menge an IAA aus. So wurde für Auxin selbst (s. o., Vande Broek *et al.*, 1999), aber auch für wasserlösliche Vitamine eine induzierende Wirkung beschrieben. Bei letzteren erwiesen sich z.B. Pyridoxin und Nicotinsäure als sehr effektiv: Pyridoxin steigerte die IAA-Abgabe um das Doppelte (Zakharova *et al.*, 2000).

1.3 *Arabidopsis thaliana*

Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) aus der Familie der Brassicaceen gilt heute als ideales Modellsystem für die Untersuchung und Aufklärung pflanzlicher Vorgänge. Die Gründe dafür sind vielfältig. Aufgrund der geringen Größe (30 bis 40 cm) und den kurzen Generationszeiten (6 bis 8 Wochen) ist die Pflanze einfach in der Handhabung (Meinke *et al.*, 1998). Ein weiterer Vorteil der Modellpflanze *Arabidopsis* ist die große Anzahl von Mutanten, die für entwicklungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen zur Verfügung stehen. Ferner wurden bei *Arabidopsis thaliana* bereits Inokulationsversuche mit unterschiedlichen PGPR-Bakterien durchgeführt. So konnten Persello-Cartieaux *et al.* (2001) *Pseudomonas thivervalensis* als natürlichen Wurzelkolonisierer des *Arabidopsis*-Ökotyps WS nachweisen. Dubrovsky *et al.* (1994) zeigten, daß eine Inokulation von *Arabidopsis*-Samen (Ökotyp Columbia) mit *Azospirillum brasilense* Sp245 innerhalb von drei Tagen nach der Keimung zu einer Verdopplung der Wurzelhaarlänge führte. Abgesehen davon ist die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms im Jahr 2000 abgeschlossen worden, so daß fundierte Informationen über die genetische Ausstattung der Pflanze vorhanden sind (Eckardt, 2000; *The Arabidopsis Genome Initiative* [AGI], 2000). Das *Arabidopsis*-Genom besteht aus fünf Chromosomen mit insgesamt 25498 Genen und hat eine Größe von 125 Mb (Bouché und Bouchez, 2001). 69% der Gene sind aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten zu Genen anderer Organismen funktionell klassifiziert. Bei 9% der Gene wurde die Funktion bereits experimentell nachgewiesen (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Mäser *et al.* (2001) berichten, daß etwa 5% der Gene des *Arabidopsis*-Genoms für membranintegrale Transportproteine kodieren. Zu diesen gehören u. a. Ionen-Transporter und -Kanäle.

1.3.1 Die Aufnahme von Ionen in die Pflanze

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise können die meisten Pflanzen neue Nährstoffressourcen nur durch Wachstum erschließen. Da die Aufnahme anorganischer Ionen vor allem über den Boden erfolgt, spielt das Wurzelsystem dabei eine zentrale Rolle. Generell kann eine Pflanze die im Boden befindlichen Ionen über den apoplastischen oder den symplastischen Weg in Richtung Xylem transportieren (Abbildung 1.2; De Boer, 1999). Beim apoplastischen Transport gelangen die Ionen über die Interzellularräume der Epidermis und des Cortex bis zum Casparischen Streifen in der Endodermis, wo der Transport dann spätestens in den symplastischen Transport übergeht. Der Casparische Streifen bildet durch seinen hydrophoben Charakter eine Art natürliche Barriere für Ionen und verhindert deren unkontrollierte Aufnahme in die Pflanze. Der symplastische Ionen-Transport verläuft ausschließlich intrazellulär und setzt voraus, daß die Ionen zuvor aus dem extrazellulären Raum über membranintegrale Transportsysteme in das Cytoplasma der Zelle gelangen. Die Ionen werden dann über Plasmodesmen bis hin zum Xylem weitertransportiert und gelangen von hier aus in den oberirdischen Teil der Pflanze (De Boer, 1999).

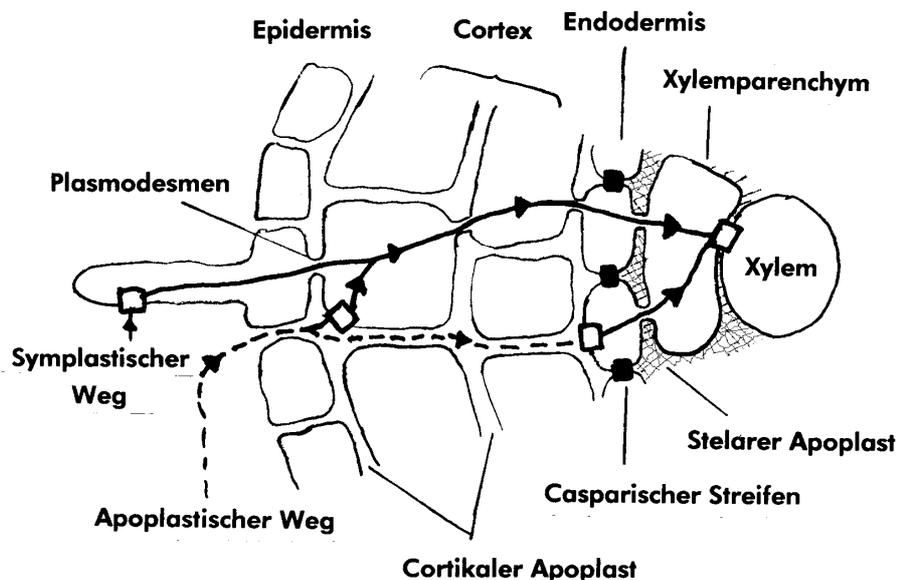


Abb. 1.2

Schematische Darstellung der Transportwege für aufgenommene Ionen. Während der apoplastische Weg durch die cortikalen Interzellularräume bis zum Casparischen Streifen erfolgt, verläuft der symplastische Weg von Zelle zu Zelle über Plasmodesmen (De Boer, 1999, modifiziert).

Allgemein lassen sich die für den Membrantransport von Ionen spezifischen Systeme in zwei Klassen unterteilen (Logan *et al.*, 1997). Diese unterscheiden sich generell in der Form der Energetisierung. Bei aktiven (primären) Transportprozessen wird die Energie für den Transport der Ionen aus der Spaltung einer kovalenten Bindung, meist ATP, bezogen (Logan *et al.*, 1997). Zu den aktiven Transportern gehören z.B. die H⁺-ATPasen (Protonenpumpen), die Protonen unter Energieverbrauch aus den Zellen schleusen („pumpen“) (Chrispeels *et al.*, 1999). Zu den passiven (sekundären) Systemen gehören Ionenkanäle und Carrier. Die Ionenkanäle vermitteln den passiven Transport von Ionen entlang einem elektrochemischen Gradienten. Bei Carriern wird der Transport dadurch ermöglicht, daß die Ionen entweder mit anderen Ionen im Symport transportiert werden oder daß während eines Antiports ein Ion gegen ein gleichgeladenes ausgetauscht wird (Maathuis und Sander, 1995; Reintanz, 1997). Im Gegensatz zu Ionenkanälen unterliegen Carrier-Systeme für die Dauer des Transports einer Konformationsänderung und zeichnen sich deshalb durch eine niedrigere Transportkapazität aus (etwa 10³ Ionen/sec. gegenüber 10⁷ bis 10⁹ Ionen/sec. bei den Kanälen) (Maathuis *et al.*, 1997; Zimmermann und Sentenac, 1999; Chrispeels *et al.*, 1999).

1.3.2 Bedeutung und Aufnahme von Kalium

Von allen für das Pflanzenwachstum essentiellen Ionen weist das einwertige Kation Kalium (K⁺) die höchste Konzentration innerhalb der Pflanzenzelle auf. So können im Cytoplasma einer Zelle K⁺-Konzentrationen von 100 bis 200 mM erreicht werden (Basset *et al.*, 1995). Rein funktionell sind K⁺-Ionen an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie z.B. der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, des Turgors, des internen pH-Wertes, des osmotischen Drucks, des Membranpotentials und als Co-Faktor an der Aktivierung zahlreicher Enzyme (Basset *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1993). Kalium spielt auch eine Rolle bei der Signaltransduktionskette im Rahmen der Pathogenantwort (Zimmermann *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind K⁺-Ionen bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen wie der Zellteilung und der Samen-Keimung essentiell notwendig (Hedrich *et al.*, 1998).

Der Transport von K⁺-Ionen kann sowohl über Ionenkanäle als auch über Carrier erfolgen, die in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind. Dabei sind hoch- und niedrigaffine Systeme zu unterscheiden (Spalding *et al.*, 1999). Obwohl im allgemeinen angenommen wird, daß K⁺-Kanäle zu den niedrigaffinen Transportsystemen gehören und bei höheren externen K⁺-Konzentrationen (>300 µM) den K⁺-Strom vermitteln (Hedrich und Dietrich, 1996), konnte für den aus der *Arabidopsis*-Wurzel isolierten K⁺-Kanal AKT1 gezeigt werden, daß dieser auch bei einer externen K⁺-Konzentration von 10 µM K⁺-Ionen aufnimmt (Hirsch *et al.*, 1998).

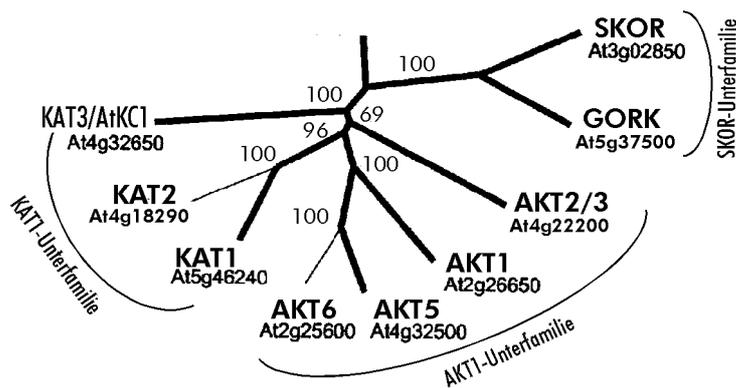


Abb. 1.3

Phylogenetischer Stammbaum von *Arabidopsis*-K⁺-Kanälen des Shaker-Typs. Die Kanäle sind weiter unterteilt in die Depolarisations-aktivierten SKOR/GORK-Kanäle und die Hyperpolarisations-aktivierten KAT- und AKT-Kanäle. Unter den Namen der Kanäle sind die AGI Genome Codes angegeben (<http://plantst.sdsc.edu/>). Die Zahlen-Werte (in Prozent) wurden mit Hilfe der Bootstrap-Analyse ermittelt. (Mäser *et al.*, 2001, modifiziert)

Einige pflanzliche K⁺-Kanäle zeigen strukturelle Homologien zu tierischen Shaker-K⁺-Kanälen und werden deshalb zur Familie der Shaker-Kanäle gezählt, die sich wiederum aus drei Unterfamilien zusammensetzt (Abb. 1.3; Sentenac *et al.*, 1992; Pongs, 1992; Hedrich *et al.*, 1998). Die tierischen Shaker-Kanäle wurden erstmals aus einer *Drosophila melanogaster*-Mutante isoliert. Ein funktionsfähiger, in der pflanzlichen Membran integrierter K⁺-Kanal des Shaker-Typs setzt sich aus insgesamt vier α -Untereinheiten zusammen (Daram *et al.*, 1997). Eine α -Untereinheit umfaßt, wie bei tierischen Shaker-Kanälen, sechs Transmembransegmente (Abb. 1.4), wobei die Porenregion (H5) zwischen den Segmenten S5 und S6 gebildet wird (Becker *et al.*, 1996). Die Porenregion bestimmt die Ionenselektivität bei allen bisher charakterisierten Kanälen der Shaker-Familie. Das vierte Transmembransegment (S4) dient offenbar als Spannungssensor und registriert das aktuelle Membranpotential (Hedrich *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1996). Dadurch öffnet bzw. schließt der K⁺-Kanal letztendlich spannungsabhängig. Zu den ersten aus *Arabidopsis thaliana* isolierten K⁺-Kanälen des Shaker-Typs gehören AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) und KAT1 (Andersson *et al.*, 1992; Schachtmann *et al.*, 1992). Sie sind für die Aufnahme von K⁺-Ionen in die Zelle verantwortlich und werden durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert. Während KAT1 für die K⁺-Aufnahme in den Schließzellen der Stomata verantwortlich ist (Gaymard *et al.*, 1998; Schachtman, 2000), vermittelt der in der Pflanzenwurzel lokalisierte Kanal AKT1 vermutlich die K⁺-Aufnahme aus dem Boden.

Mit AKT2/3 wurde ein weiterer K⁺-Kanal aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Cao *et al.*, 1995; Ketchum und Slayman, 1996). Dieser Kanal ist schwach spannungsabhängig und in Blattmesophyll-Zellen und im Phloem lokalisiert (Marten *et al.*, 1999; Uozumi *et al.*, 1998; Schachtman, 2000; Dennison *et al.*, 2001; Geiger *et al.*, 2002). Reintanz (1997) und Ivashikina *et al.* (2001) zeigten, daß mit AtKC1 (synonym KAT3) neben AKT1 noch ein weiterer K⁺-Aufnahme-Kanal des Shaker-Typs in der Wurzel und dort besonders in den Wurzelhaaren vorkommt. Neueste Studien von Reintanz *et al.* (2002) identifizierten AtKC1 als eine α -Untereinheit, die zusammen mit

Untereinheiten von AKT1 einen funktionellen K^+ -Aufnahmekanal in der Wurzel bilden kann. Die Bildung eines solchen AtKC1/AKT1-Heteromers führt zu einem Kanal mit veränderten Aufnahmeeigenschaften in bezug auf die Öffnungswahrscheinlichkeit, die Aktivierungskinetik und die Ionenselektivität.

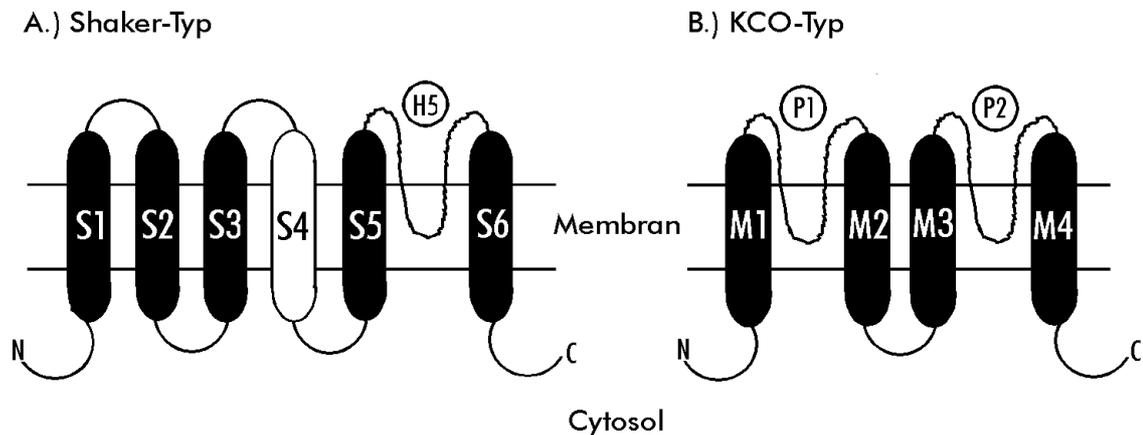


Abb. 1.4

Struktureller Vergleich der Untereinheiten von K^+ -Kanälen vom Shaker- und KCO-Typ. Während der Shaker-Typ (A.) sechs transmembrane Segmente (S1 bis S6) mit einer Porenregion (H5) aufweist, finden sich beim KCO-Typ (B.) vier transmembrane Segmente (M1 bis M4) mit zwei Porenregionen (P1 und P2) pro Untereinheit.

Mit SKOR (Gaymard *et al.*, 1998) und GORK (Ache *et al.*, 2000) wurden K^+ -Ionen-Abgabe-Kanäle in *Arabidopsis thaliana* identifiziert. SKOR wurde im Xylemparenchym der Pflanzenwurzel gefunden, vermittelt dort die Abgabe von K^+ -Ionen an das Xylem und ist somit an der Versorgung der oberirdischen Pflanzenorgane mit K^+ -Ionen beteiligt. Der Ionenkanal GORK wurde aus Schließzellen isoliert (Ache *et al.*, 2000) und wird auch in Wurzelhaaren exprimiert (Ivashikina *et al.*, 2001; Reintanz *et al.*, 2002). Sowohl SKOR als auch GORK gehören zu den Kanälen des Shaker-Typs und weisen damit die in Abbildung 1.4 dargestellte Struktur auf. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Kanälen werden SKOR und GORK jedoch durch Depolarisierung der Zellmembran aktiviert.

Eine weitere Gruppe von K^+ -Kanälen konnte mit den KCO-Kanälen identifiziert werden (Czempinski *et al.*, 1997). Diese unterscheiden sich von den Kanälen der Shaker-Familie in ihrem strukturellen Aufbau (Abb. 1.4). Die KCO-Kanäle bestehen aus vier Transmembransegmenten (M1 bis 4), die zwei Porenregionen (P1 und P2) bilden. KCO1, der erste Kanal dieser Familie aus *Arabidopsis thaliana*, konnte im Blattmesophyll, den Schließzellen, dem Leitgewebe, dem Bereich der Wurzelspitzen und dem Zentralzylinder der Wurzel nachgewiesen werden. Dort haben Czempinski *et al.* (2002) KCO1 in der Vakuolenmembran (Tonoplast) lokalisiert. Schönknecht *et al.* (2002) vermuten, daß KCO1 ein Bestandteil der langsam aktivierten Vakuolenkanäle (*slow-activating vacuolar ion channels*) ist. Die Aktivierung dieses Kanals erfolgt durch cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen im nanomolaren Bereich

(Czempinski *et al.*, 1997; Czempinski *et al.*, 1999; Mäser *et al.*, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien zu KCO1 konnten mit KCO2, KCO4, KCO5 und KCO6 weitere Kanäle des KCO-Typs identifiziert werden (Mäser *et al.*, 2001; Very und Sentenac, 2002). Über Funktion und Expressionsmuster dieser Kanäle gibt es jedoch bislang keine Erkenntnisse.

Zur Zeit ist wenig über die Regulation der beschriebenen K⁺-Kanäle auf transkriptioneller Ebene bekannt. Es scheint jedoch, daß Kaliummangel die Expressionsstärke der bisher untersuchten *Arabidopsis*-K⁺-Kanäle nicht beeinflusst (Basset *et al.*, 1995). Deeken *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die Expression des Phloemkanals AKT2/3 lichtinduziert ist und vermuten, daß die Anreicherung von Produkten der CO₂-Assimilation während der Photosynthese eine Induzierung dieses Kanals zur Folge hat. Neuere Erkenntnisse lassen auch auf eine Beteiligung von Phytoeffektoren bei der Regulation des K⁺-Haushalts schließen (Becker und Hedrich, 2002). So erwies sich der Wurzelaufnahmekanal AtKC1 als ein Kanal, dessen Expression durch Cytokinin induziert wird (Reintanz, 1997). In den Koleoptilen von Mais konnte mit ZMK1 ein auf transkriptioneller Ebene Auxin-induzierter K⁺-Kanal identifiziert werden (Philippar *et al.*, 1999).

1.4 Phytoeffektoren und ihre Wirkungen

Phytoeffektoren sind Moleküle, die als Signal- und Botenstoffe bei pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsprozessen, wie z. B. Zellteilung, Seitenwurzelbildung und Fruchtreifung, beteiligt sind. Sie können entweder direkt am Wirkort gebildet oder nach der Synthese über das Leitgefäßsystem zu anderen Teilen der Pflanze transportiert werden, um dort biochemische Vorgänge zu induzieren. Zu den wichtigsten Phytoeffektoren gehören verschiedene Auxine und Gibberelline sowie Abscisinsäure, Ethylen und Jasmonate. Im Folgenden sind nur die für diese Arbeit wichtigen Gruppen der Gibberelline und Auxine näher beschrieben.

Gibberelline

Gibberelline gehören zur Stoffgruppe der Diterpene. Sie sind in höheren Pflanzen weit verbreitet und üben als Phytoeffektoren eine wichtige Kontrollfunktion bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen von Pflanzen aus (Hedden, 1999). Zu den nachgewiesenen Effekten von Gibberellinen gehören die Induktion der Samenkeimung sowie die Förderung von Sproßwachstum und Blütenbildung (Cowling und Harberd, 1999; Olszewski *et al.*, 2002). Außerdem ist die Regulation der Gibberellinsynthese eng mit der Photoperiode korreliert (Gray und Estelle, 1998).

Auxine

Pflanzen synthetisieren eine Reihe verschiedener Auxine. Zu den wichtigsten gehören Indol-3-Essigsäure (IAA), Indol-3-Buttersäure (IBA) und 4-Chlorindol-3-Essigsäure (4-Cl-IAA). Von diesen Auxinen nimmt die Indol-3-Essigsäure eine Schlüsselrolle ein. Die Wichtigkeit dieses Effektors wird dadurch belegt, daß wie bei den Azospirillen (1.2.3) auch in Pflanzen mehrere IAA-Synthesewege existieren (Dolan, 1998; Davies *et al.*, 1999). So verfügen Pflanzen ebenfalls über Tryptophan-abhängige und -unabhängige Synthesewege (Bartel, 1997; Normanly und Bartel, 1999). Ein Großteil der Indol-3-Essigsäure liegt in Pflanzen in konjugierter (inaktiver) Form vor und kann bei Bedarf durch Hydrolyse aktiviert werden (Davies *et al.*, 1999; Tam *et al.*, 2000; Eckardt, 2001). Die Wirkungen, die IAA innerhalb der Pflanze entfaltet, sind vielfältig und zeigen eine starke Abhängigkeit von der Konzentration im Gewebe (Goldsmith, 1993; Rahman *et al.*, 2001b; Kerk *et al.*, 2000). Beobachtet wurde unter anderem die Induktion primären vaskularen Gewebes sowie ein Einfluß auf Zellstreckung und Zellteilung, welcher sich durch sichtbare morphologische Veränderungen bemerkbar macht (Sabatini *et al.*, 1999; Kepinski und Leyser, 2002). So werden Auxine vor allem für die Bildung und Verzweigung von Seitenwurzeln verantwortlich gemacht (Reed *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Van den Berg *et al.*, 1998; DeBilly *et al.*, 2000; Dubrovsky *et al.*, 2000). Auxine werden von der Pflanze in den jungen Blättern und im Sproßapex gebildet, von wo aus sie dann durch das vaskuläre Gewebe in die Wurzel und schließlich zu den kortikalen und epidermalen Zellen transportiert werden (Dolan, 1998; Friml und Palme, 2002). Aufgrund der vielseitigen und sehr sensitiven Reaktion auf physiologischer Ebene, ist nicht nur die Synthese, sondern auch der Transport von Auxinen einer strengen Kontrolle unterworfen. Mittlerweile sind spezifische Auxintransporter identifiziert worden, die sowohl den Influx als auch den Efflux von Auxinen über die Zellmembran vermitteln und dadurch die Transportkontrolle gewährleisten. In diesem Zusammenhang seien zum Beispiel die vermutlich für den polaren Auxin-Transport u. a. verantwortlichen Transporter AtPIN2 und AUX1 aus *Arabidopsis thaliana* genannt (Estelle, 1998). Der Efflux-Carrier AtPIN2 wurde aus der Wurzelspitze sowie aus den Membranen kortikaler und epidermaler Zellen der meristematischen Zone isoliert (Müller *et al.*, 1998). Der für den Auxin-Influx verantwortliche Carrier AUX1 ist ebenfalls im apikalen Meristem der Wurzel lokalisiert (DeBilly *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2001). Funktionell ist AUX1 an der Bildung von Seitenwurzeln und offenbar an dem für Pflanzen charakteristischen Gravitropismus beteiligt (Bennett *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 2001a). Bennett *et al.* (1996) beobachteten, daß Pflanzen bei denen das *aux1*-Gen defekt ist (AUX1-Verlust-Mutanten), kein gravitropes Wachstum mehr zeigen. Ebenfalls konnte bei diesen Mutanten nach einer Auxinbehandlung keine Inhibierung des Wurzelwachstums festgestellt werden. Aus diesem Grund wird die AUX1-Mutante als Auxin-resistent bezeichnet (Pickett *et al.*, 1990).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stehen die molekularen Mechanismen, die am Aufbau einer Pflanzen-Bakterien-Assoziation beteiligt sind. Das Wachstum einer Pflanze unterliegt u. a. der Kontrolle durch Phytoeffektoren und korreliert ebenfalls mit der Aktivität membranintegrityaler K^+ -selektiver Ionenkanäle. Da eine Inokulation von Pflanzen mit *Azospirillum brasilense* nachweislich zu einer Steigerung des Pflanzenwachstums führt, liegt die Vermutung nahe, daß die Regulation von pflanzlichen K^+ -Kanälen auf transkriptioneller Ebene eine Rolle bei der Assoziation zwischen Pflanze und Bakterien spielen könnte. Dies sollte anhand eines Modellsystems geprüft werden. Als Modellpflanze wurde *Arabidopsis thaliana* gewählt, weil diese Pflanze einerseits auf eine Kolonisierung mit PGPR-Bakterien nachweislich mit einem verbesserten Wachstum reagiert und andererseits von dieser Pflanze diverse Mutanten für die Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der Arbeit sollte geklärt werden, ob ...

- *Arabidopsis thaliana* für Azospirillen chemotaktisch wirksame Substanzen exsudiert.
- die Bakterien die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* dauerhaft besiedeln.
- *Azospirillum brasilense* das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* fördern kann.
- bakteriell produzierte Ausscheidungsprodukte (Ammonium, Phytoeffektoren) das Wachstum von *Arabidopsis* auf makroskopischer und molekularer Ebene beeinflussen.
- eine Inokulation mit *Azospirillum brasilense* einen Einfluß auf die Expression von K^+ -Kanälen hat.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzen, Bakterien und Plasmide

2.1.1 Pflanzen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden folgende Pflanzen verwendet:

Pflanze	Eigenschaften
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ökotyp Columbia (Col-0), Wildtyp
<i>A. thaliana</i> AtKC1-k.o.	Ökotyp Col-0, Verlust-(k.o.)-Mutante („footprint“), <i>atkc1</i> -Gen wird nicht mehr exprimiert (A. Szyroki, K. Palme, Max-Delbrück-Laboratorium, Köln)
<i>A. thaliana</i> AtKC1p::GUS	Ökotyp Col-0, <i>gusA</i> -exprimierende Mutante (T5 homozygot), <i>gusA</i> ist gekoppelt an <i>atkc1</i> -Expression (A. Szyroki, K. Palme, Max-Delbrück-Laboratorium, Köln)
<i>A. thaliana</i> SKOR-k.o.	Ökotyp WS, Verlust-(k.o.)-Mutante (T-DNA-Insertion), <i>skor</i> -Gen wird nicht mehr exprimiert (Gaymard <i>et al.</i> , 1998)
<i>A. thaliana</i> AUX1-k.o.	Ökotyp Col-0, Auxin- und Ethylen-resistente Mutante, bei der die Expression des <i>aux1</i> -Gens gestört ist (Pickett <i>et al.</i> , 1990; Marchant <i>et al.</i> , 1999)
<i>A. thaliana</i> AUX1::GUS	Ökotyp WS, <i>gusA</i> -exprimierende Mutante, <i>gusA</i> ist an <i>aux1</i> -Expression gekoppelt (M. Bennett, Sutton Bonington, Warwick)
<i>A. thaliana</i> DR5::GUS	Ökotyp Col-0, <i>gusA</i> -exprimierende Mutante, <i>gusA</i> ist mit AuxRE-Elementen gekoppelt (Sabatini <i>et al.</i> , 1999; Ulmanov <i>et al.</i> , 1997)

2.1.2 Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme sind nachfolgend aufgeführt:

Bakterienart	Eigenschaften
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Wildtyp-Stamm (DSM1690), isoliert aus der Rhizosphäre von <i>Digitaria decumbens</i> (Tarrand <i>et al.</i> , 1978).
<i>Azospirillum brasilense</i> SpM7918	Stamm Sp6, <i>ipdc::Tn5</i> -Mutante, zeigt verringerte IAA-Synthese, Kanamycin-Resistenz (Costacurta <i>et al.</i> , 1994)
<i>Azospirillum brasilense</i> FT326	Stamm Cd, scheidet große Mengen IAA aus (Hyperproduzierer), 5-Fluoro-Tryptophan-Resistenz (Hartmann <i>et al.</i> , 1983).
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 pFAJ31.13	Stamm Sp7 mit <i>gusA</i> -Reporter Plasmid, Tetracyclin-Resistenz (Vande Broek <i>et al.</i> , 1993)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 pFAJ21	Stamm Sp245 mit plasmidcodierter <i>nifH-gusA</i> Fusion, Tetracyclin-Resistenz (Vande Broek <i>et al.</i> , 1993).
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 p519ngfp	Stamm Sp7 mit plasmidcodierter Fähigkeit, das <i>green fluorescent protein</i> (GFP) auszubilden, Neomycin-Resistenz, Kanamycin-Resistenz (diese Arbeit).
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Wildtyp-Stamm (DSM9544), phytopathogenes Bakterium
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α (pGEMHE-AtKC1) bzw. (pBS II KS \pm 18S-rRNA)	<i>hsdR17 endA1 thi-1 gyrA96 relA1 recA1 supE44 DlacU169 (f80lacZDM15)</i> , enthält pGEMHE-AtKC1 bzw. pBS II KS \pm 18S-rRNA (diese Arbeit)
<i>E. coli</i> S-17-1 (p519ngfp)	<i>pro thi hsdR recA</i> , chromosomale Integration von RP4-2-Tc::Mu-KM::Tn7, Sm ^r , Tp ^r , Tc ^r , Tra ⁺ , Donorstamm für p519ngfp (diese Arbeit)

2.1.3 Plasmide

p519ngfp	ATCC 87453, Kan ^R , Neo ^R , enthält <i>gfp</i> -Gen mit konstitutivem npt2-Promoter in XbaI-Restriktionsstellen (Matthysse <i>et al.</i> , 1996)
pGEMHE-AtKC1	Ap ^R , enthält 2,1 kb-Fragment von AtKC1 in BamHI-EcoRI-Restriktionsstellen
pBS II KS ± 18S-rRNA	Ap ^R , enthält 1,8 kb-Fragment der 18S-rRNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in EcoRI-Restriktionsstellen

2.2 Kulturmedien

MS^{1/2}-Grundmedium

Dieses Medium ist eine Modifikation des Pflanzenmediums nach Murashige und Skoog (1962). Die Modifikationen bestehen darin, daß von KNO₃, KH₂PO₄, CaCl₂, MgSO₄, Glycin und den Vitaminen Nicotinsäure, Pyridoxin- und Thiamin-Hydrochlorid nur die Hälfte der im Originalrezept verwendeten Mengen eingesetzt wurden. Das Medium wurde für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* verwendet.

KNO ₃	9,50	g
KH ₂ PO ₄	0,85	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,20	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,85	g
Saccharose	20,00	g
H ₃ BO ₃	6,20	mg
MnSO ₄ · H ₂ O	16,90	mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,60	mg
KI	0,83	mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg
Fe-Na-EDTA	36,70	mg
Nicotinsäure	0,25	mg
Pyridoxin-Hydrochlorid	0,25	mg
Thiamin-Hydrochlorid	0,05	mg
Glycin	1,0	mg
Aqua bidest.		ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 0,1 N KOH auf 5,7 bis 5,8 eingestellt. Zur Herstellung von Festmedium wurde dem Medium 15 g/l Agar zugefügt.

NFb-VK-Medium

Das NFb-VK-Medium (Döbereiner, 1980) wurde für die Kultivierung von *Azospirillum brasilense* verwendet, ggf. wurde das Medium mit Antibiotika (s. u.) versetzt.

DL-Malat	5,0 g
KOH	4,5 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Fe-EDTA	65,0 mg
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	20,0 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	2,35 mg
H ₃ BO ₃	2,8 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,0 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,24 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08 mg
NH ₄ Cl	0,5 g
Bromthymolblaulösung (0,5% in 0,2 N NaOH)	2 ml
Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 1 N KOH auf 6,8 eingestellt. Zur Herstellung von Festmedium wurde dem Medium 15 g/l Agar zugefügt.

Antibiotikastammlösungen

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration	verwendet für:
5-Fluoro-Tryptophan	25 mg/ml	100 µg/ml	<i>A. brasilense</i> Cd FT326
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	pGEMHE-AtKC1
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	<i>A. brasilense</i> SPM7918
Neomycin	60 mg/ml	60 µg/ml*	<i>A. brasilense</i> Sp7 p519ngfp
Tetracyclin	10 mg/ml	10 µg/ml	<i>A. brasilense</i> pFAJ31.13 <i>A. brasilense</i> Sp245 pFAJ21

* gilt für Festmedien. In Flüssigmedien wurden nur 20 µg/ml eingesetzt.

LB-Medium

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Für Festmedium wurden der Lösung 0,5 g NaCl anstatt 5,0 g, sowie 15 g/l Agar zugefügt. Gegebenenfalls wurden dem Medium Antibiotika zugefügt (s. o.).

YEP-Malat-Medium

Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
DL-Malat	5,0 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Für Festmedium wurden der Lösung 15 g/l Agar zugefügt.

Saline (physiologische Kochsalzlösung)

NaCl	9,0 g
Aqua bidest.	ad 1 l

2.3 Lösungen für die Molekularbiologie

Zum Ansetzen der Lösungen wurden ausschließlich Chemikalien der Reinheitsstufe „Für die Molekularbiologie“ verwendet.

DEPC-Wasser

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	1 ml
Aqua bidest.	1 l

Die Suspension wurde mehrere Stunden gerührt und anschließend zum vollständigen Entfernen des DEPC zweimal autoklaviert.

DNA-Gel

Agarose	1 g
1x TBE-Puffer	100 ml
Ethidiumbromidlösung (2 mg/ml)	5 μ l

Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen mit der Ethidiumbromidlösung versetzt. Das Gel wurde dann in eine Gelform gegossen und zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

10x TBE-Puffer

TRIS	108,90 g
Na ₂ -EDTA	7,44 g
H ₃ BO ₃	55,67 g
DEPC-Wasser	ad 1 l

GUS-Färbelösung

KH_2PO_4	13,6 g
K_2HPO_4	17,4 g
X-GlcA (Cyclohexylammonium Salz)	0,5 g
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,33 g
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	0,42 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des gelösten X-GlcA wurde die Färbelösung immer erst am Tag des entsprechenden Versuches hergestellt.

Hybridisierungspuffer

Na-Pi-Puffer	250 ml
EDTA-Lösung (0,5 M)	2 ml
SDS (20%ige Lösung)	350 ml
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	10 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Für die Herstellung des Na-Pi-Puffers wurden 100 ml einer 1 M NaH_2PO_4 -Lösung mit einer 1 M Na_2HPO_4 -Lösung (mindestens 400 ml) auf pH 7,2 eingestellt.

RNA-Gel

DEPC-Wasser	100 ml
Agarose	1 g
10x MEN-Puffer	10 ml
Formaldehyd (37%)	18,3 ml

Das DEPC-Wasser und die Agarose wurden in der Mikrowelle aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 10x MEN-Puffer und dem Formaldehyd versetzt. Die Lösung wurde dann in eine Gelform gegossen und zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

RNA-Probenpuffer

Formamid	0,72 ml
10x MEN-Puffer	0,16 ml
Formaldehyd	0,26 ml
Glycerin (80%)	0,10 ml
Bromphenolblau (gesättigte Lösung)	0,08 ml
Xylencyanol FF (gesättigte Lösung)	0,08 ml
DEPC-Wasser	0,10 ml
Ethidiumbromidlösung (2mg/ml)	2 μl

TE-Puffer

TRIS	1,21 g
EDTA	0,38 g
Aqua bidest.	ad. 1 l

Die Lösung wurde mit HCl auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

10x MEN-Puffer

Na-Acetat	4,10 g
EDTA	2,92 g
MOPS	41,86 g
DEPC-Wasser	ad 1 l

Zum Ansetzen der Lösung wurden nur Geräte (Meßzylinder, Spatel, Flaschen) verwendet, die RNase-frei waren. Der Puffer wurde mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt, dann sterilfiltriert und abgedunkelt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

20x SSC-Stammlösung (Transferpuffer für Northern-Blot)

NaCl	(3 M) 175,32 g
Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O	(0,3 M) 88,23 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Der Puffer wurde mit 12%iger HCl auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde der Puffer noch in einem 1:1-Verhältnis mit H₂O verdünnt und als 10x SSC eingesetzt.

2.4 Methoden**2.4.1 Pflanzenanzucht**

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer bei einer Licht/Dunkel-Periode von 12/12 Stunden und einer konstanten Temperatur von 23 °C.

2.4.1.1 Samensterilisierung

Zur sterilen Anzucht von *Arabidopsis thaliana* wurden die Samen vor der Keimung zunächst in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß für eine Minute in 70%igem Ethanol suspendiert. Nach dem Entfernen des Ethanols wurden 900 µl Natrium-Hypochlorid-Lösung (Fa. Riedel de Haën, 6 bis 14% aktives Chlor) zu den Samen pipettiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Eppendorf-Schüttler bei

1400 UpM wurde die Lösung dann solange mit Wasser verdünnt, bis es zum Absinken der Samen im Hypochlorid kam. Das Verdünnen der Natrium-Hypochlorid-Lösung erleichterte das Abpipettieren der Flüssigkeit. Zum Entfernen des überschüssigen Hypochlorids wurden die Samen abschließend drei mal in 1 ml sterilem Wasser für jeweils 10 min auf dem Eppendorf-Schüttler gewaschen. Vor der Weiterverwendung wurden die behandelten Samen über Nacht in sterilem Wasser bei 4 °C aufbewahrt.

2.4.1.2 *Arabidopsis-thaliana*-Kultivierung für Morphologie- und GUS-Untersuchungen

Ausplattieren der Samen

Um die Keimlinge später einzeln aufnehmen zu können, war es erforderlich, die sterilisierten Samen (2.4.1.1) für die Morphologie-Versuche separat auf Agarplatten mit MS $\frac{1}{2}$ -Grundmedium (2.2) auszuplattieren. Zu diesem Zweck wurden die Samen in ca. 10 ml sterilem Wasser in einer Petrischale suspendiert und dann einzeln mit Hilfe einer Eppendorfpipette auf einer Agarplatte plaziert. Jede Agarplatte wurde mit ca. 35 bis 40 Samen bestückt, mit Parafilm verschlossen und in vertikaler Position für zwei Tage im Dunkeln bei 23 °C aufbewahrt. Danach wurden die Platten zunächst für 96 Stunden in einer Klimakammer bei 12 h Licht und 23 °C inkubiert, bevor sie schließlich für die nachfolgenden Versuchsansätze verwendet wurden.

Inokulieren des Wurzelsystems für Morphologie-Untersuchungen

Für Morphologieversuche wurden die vier Tage alten Pflanzen (s. o.) einzeln mit einer Federstahlpinzette vorsichtig von der Agarplatte abgelöst, mit den Wurzeln durch eine Bakteriensuspension ($OD_{578}=1$; 2.4.2.2) gezogen und schließlich auf eine frische Agarplatte ($\varnothing=8,5$ cm) gelegt. Dazu wurden jeweils 5 Pflanzen im oberen Drittel der Platte auf einer Linie plaziert. Die Wurzeln der Kontrollpflanzen wurden nur mit Saline behandelt. Abschließend wurden alle Platten mit Parafilm umwickelt und in vertikaler Position in der Klimakammer (2.4.1) für 14 Tage inkubiert. Die Platten wurden anschließend mit einer Spiegelreflexkamera (Fa. Canon, EOS 500) fotografiert (makroskopische Aufnahmen). Um Spiegelungen zu vermeiden, war es erforderlich, die Deckel der Platten zu entfernen. Als Untergrund eignete sich schwarzer Samt.

Inkubieren der Pflanzen für die Phytoeffektorversuche

Für die Morphologie-Versuche mit Phytoeffektoren wurden die *Arabidopsis*-Samen zunächst ausplattiert (s. o.) und dann auf eine Agarplatte mit 1-NAA- (synthetisches Auxin, wirkungsgleich mit IAA, [1.4]), bzw. GA₃-haltigem (1.4) Medium überführt. Die Inkubation und Dokumentation erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die jeweils verwendeten Phytoeffektor-Konzentrationen im Medium sind bei den Experimenten angegeben.

Inokulieren des Wurzelsystems für GUS-Experimente

Nach dem Ausplattieren und Inokulieren der Pflanzen (s. o.) wurden die Agarplatten lediglich 7 statt 14 Tage in der Klimakammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Pflanzen von der Agaroberfläche abgelöst, zweimal mit Saline gewaschen und in Schraubdeckelgläschen mit 3 bis 4 ml GUS-Färbelösung (2.3) überführt. Die Aktivität der β -Glucuronidase und die damit eintretende Blaufärbung wurde nach Über-Nacht-Inkubation der Pflanzen bei 35 °C im Brutschrank überprüft. Die gefärbten Pflanzen wurden mit einem Mikroskop (Fa. Zeiss, Axiophot, Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover) oder Binokular (Fa. Zeiss, SV 11 Stereomikroskop) betrachtet und fotografiert (Fa. Canon, EOS 500).

2.4.1.3 Bestimmung der Trockengewichte

Arabidopsis-Pflanzen wurden wie unter 2.4.1.2 beschrieben behandelt. Nach 14-tägiger Inkubation wurde der Sproß der Pflanzen mit einer Schere von den Wurzeln getrennt. Letztere wurden vorsichtig mit einer Pinzette von der Agarplatte gehoben und für 5 min unter Ultraschall inkubiert, um die fest verankerten Bakterien von der Wurzeloberfläche zu lösen. Wurzeln und Sprosse wurden dann getrennt voneinander bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet. In regelmäßigen Abständen wurden die Proben zum Abkühlen für 60 min in einen Exsikator überführt und anschließend gewogen. Die Trocknung wurde so lange fortgesetzt, bis sich ein konstantes Gewicht einstellte.

2.4.1.4 Pflanzenanzucht für molekularbiologische Versuche

Ausplattieren der Samen

Zunächst wurden die MS $\frac{1}{2}$ -Grundmedium-Agarplatten (2.2) mit Rundfiltern (Fa. Schleicher & Schuell, Nr. 1573, \varnothing 90 mm) bestückt. Die Filter wurden dann mit 1 ml sterilem Wasser vollständig befeuchtet. Anschließend wurden die zuvor sterilisierten und in Wasser suspendierten Samen (2.4.1.1) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf einer Linie im oberen Drittel des Filters plaziert. Auf diese Weise konnten ca. 50 bis 60 Samen pro Platte einzeln nebeneinander gelegt werden. Die Platten wurden schließlich mit Parafilm verschlossen und in vertikaler Position für zwei Tage im Dunkeln bei 23 °C aufbewahrt. Danach wurden die Platten zunächst für vier Tage in der Klimakammer (2.4.1) inkubiert, bevor sie schließlich für die nachfolgenden Versuchsansätze verwendet wurden.

Inokulieren der Pflanzen

Für die Inokulation wurden die Pflanzenwurzeln mit einer Bakteriensuspension ($OD_{578}=1$; 2.4.2.2) bzw. mit Saline (Kontrollpflanzen) betupft. Dazu wurde ein steriler Wattebausch mit der Suspension getränkt und vorsichtig auf die Wurzeln gesetzt. Nachfolgend wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und für neun Tage in vertikaler Position in der Klimakammer inkubiert.

Inkubieren auf phytoeffektorhaltigem Medium

Sterilisierte Samen wurden zunächst ausplattiert (s. o.) und mit Parafilm verschlossen. Vor Versuchsbeginn wurde ein Teil der Agarplatten 5 Tage (für den 4-Tage-Versuch), ein anderer Teil 9 Tage (für den 3-Stunden-Versuch) in der Klimakammer inkubiert. Danach wurden die Filterpapierscheiben mit einer sterilen Pinzette von der Agarplatte abgehoben und auf MS^{1/2}-Grundmedium-Agarplatten (2.2) mit 0,5 µM 1-NAA überführt. Die mit Parafilm verschlossenen Platten wurden 4 Tage (4-Tage-Versuch) bzw. 3 Stunden (3-h-Versuch) auf dem 1-NAA-haltigen Medium inkubiert und anschließend, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, geerntet.

Ernte der inokulierten bzw. phytoeffektorbehandelten Pflanzen

Am Tag der Ernte wurde mit einem Skalpell der Sproß von der Wurzel abgeschnitten und die Pflanzenteile getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Isolierung der Gesamt-RNA (2.4.3) bei -85 °C aufbewahrt.

2.4.1.5 Arabidopsis thaliana-Schüttelkulturen

Zum Ansetzen von Schüttelkulturen wurden etwa acht sterilisierte Samen (2.4.1.1) in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 80 ml MS^{1/2}-Grundmedium (2.2) pipettiert. Die Kolben wurden mit luftdurchlässigen Schwammkappen (Fa. Sigma) verschlossen und mit selbsthergestellten Manschetten aus handelsüblicher schwarzer Teichfolie (Baumarkt) umwickelt. In die Manschetten wurden zuvor mit einem Papierlocher in regelmäßigen Abständen Löcher gestanzt, um eine diffuse Beleuchtung der Pflanzen zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte dann bei 70 UpM auf einem Rundschüttler (Fa. Invors) in der Klimakammer (2.4.1). Ein Medienwechsel erfolgte nach drei Wochen Inkubation. Am Tag der Ernte wurde das Medium durch eine Bakteriensuspension (2.4.2.2) ersetzt.

Sofern die Pflanzen für RNA-Analysen vorgesehen waren, wurden von den Schüttelkulturen jeweils nur die Wurzeln geerntet. Dazu wurde der Wurzelballen mit zwei Pinzetten vom Sproß getrennt, abgetupft und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Isolierung der Gesamt-RNA (2.4.3) bei -85 °C aufbewahrt.

Die Pflanzen für die GUS-Kolonisierungsversuche mit *Azospirillum brasilense* FAJ 31.13 wurden hingegen zweimal mit Saline abgewaschen, um die nicht-wurzeloassoziierten Bakterien zu entfernen. Die gewaschenen Pflanzen wurden über Nacht bei 35 °C in 10 ml GUS-Färbelösung (2.3) inkubiert, anschließend unter dem Mikroskop (Fa. Zeiss, Axiophot) betrachtet und fotografiert.

Für die *gfp*-Kolonisierungsversuche mit *Azospirillum brasilense* p519ngfp wurden die Pflanzen ebenfalls, wie oben beschrieben, mit Saline gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit Blau-Licht (488 nm) angeregt, mikroskopiert und fotografiert.

2.4.2 Mikrobiologische Methoden

2.4.2.1 Bakterienanzucht

Für die Anzucht der verschiedenen *Azospirillum*-Stämme (2.1.2) wurde NFb-VK-Medium verwendet, das gegebenenfalls mit Antibiotika (2.2) versetzt wurde. Flüssigkulturen von *Azospirillum brasilense* wurden bei 30 °C auf einem Rundschtüttler mit 160 UpM inkubiert, während Agarplatten bei 35 °C im Brutschrank aufbewahrt wurden.

Flüssigkulturen von *Escherichia coli* wurden in LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum, 2.2) bei 37 °C auf einem Rundschtüttler mit 180 UpM inkubiert.

2.4.2.2 Aufbereiten der Bakterien für die Experimente

Eine Übernachtskultur (50 ml) des jeweiligen *Azospirillum*-Stammes wurde bei 6000 UpM und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Saline wurde die Suspension erneut zentrifugiert, um Reste des NFb-VK-Mediums vollständig zu entfernen. Nach dem Dekantieren des Überstandes und erneutem Resuspendieren des Pellets in etwa 3 bis 5 ml Saline wurde die optische Dichte der Suspension bei 578 nm (OD_{578}) am Photometer bestimmt. Die Bakterien wurden dann mit Saline auf eine $OD_{578} = 1$ verdünnt (für die Kultivierung auf Festmedium) bzw. auf 10^7 cfu/ml ($\hat{=}$ einer OD_{578} von 0,054; Stanke, 2000) eingestellt (für Schüttelkulturen, 2.4.1.5).

2.4.2.3 Bakterienstammhaltung

Um Spontanmutationen vorzubeugen, wurden alle Bakterienstämme (2.1.2) als Dauerkultur in Glycerin bei -85 °C eingefroren. Dazu wurde eine Bakterien-Übernachtskultur (2.4.2.1) bei 6000 UpM für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und dekantiert. Das bakterienhaltige Pellet wurde in kalter Saline resuspendiert, so daß die entstandene Suspension eine optische Dichte von etwa 2,0 bei 578 nm aufwies. Anschließend wurden jeweils 200 μ l Glycerin-Lösung (50 %) und 800 μ l Bakterien-suspension in ein steriles 2-ml-Kryogefäß pipettiert und sofort bei -85 °C eingefroren. Für jede Versuchsreihe wurden neue Kulturen aufgetaut.

2.4.2.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Gewinnung kompetenter Zellen wurden 5 ml einer Übernachtskultur (*E. coli* DH5 α oder *E. coli* S17-1, 2.4.2.1) in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und für zwei Stunden bei 37 °C und 140 UpM auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten mit gekühlten Lösungen im Eisbad. Die Bakterien-suspension wurde zunächst bei 6000 UpM und 0 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml einer 100 mM CaCl₂-Lösung (pH 8,0) resuspendiert und für 60 min im Eisbad inkubiert. Nach erneutem

Zentrifugieren wurde das Pellet in nur 5 ml der CaCl_2 -Lösung resuspendiert und mit 2,14 ml einer 50%igen sterilen Glycerin-Lösung vermischt. Abschließend wurde die Suspension zu je 200 μl in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert und bei $-85\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Zur Transformation der kompetenten Bakterienzellen wurde pro Transformationsansatz ein Eppendorfgefäß mit kompetenten *E. coli*-Zellen für 15 min im Eisbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 10 bis 20 ng eines Plasmids versetzt, mit der Pipette gemischt und für 20 min im Eisbad inkubiert. Danach folgte eine zweiminütige Inkubation im Heizblock bei $42\text{ }^\circ\text{C}$, bevor die Zellen erneut für 15 min im Eisbad aufbewahrt wurden. Abschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Zum Nachweis der transformierten Bakterien wurden die Antibiotikaresistenzen der übertragenen Plasmide (2.1.3) ausgenutzt und je 100 μL der Zellsuspension auf antibiotikahaltigem LB-Festmedium (2.2) ausplattiert.

2.4.2.5 Konjugation von *Azospirillum brasilense* Sp7

Im Rahmen einer Konjugation wird Plasmid-DNA von einem Donor-Bakterienstamm auf einen Rezipienten-Stamm übertragen. In dieser Arbeit wurde *E. coli* S17-1 p519ngfp als Donorstamm und *Azospirillum brasilense* Sp7 als Rezipienten-Stamm verwendet. Da der verwendete *E. coli*-Stamm über die für eine Konjugation nötigen Fertilitätsgene (F^+ -Gene) verfügt, war es möglich, das Plasmid p519ngfp auf *Azospirillum brasilense* Sp7 zu übertragen.

Die beteiligten Bakterien wurden zunächst über Nacht in ihrem Selektivmedium angezogen (siehe 2.1.2 und 2.4.2.1). Von den Übernachtskulturen wurden je 100 μl in 5 ml frisches Selektivmedium überimpft und für mindestens zwei Stunden inkubiert, um die logarithmische Wachstumsphase zu erreichen. Dann wurden 3 bis 5 ml jeder Kultur (je nach Wachstum) für 5 min bei 6000 UpM zentrifugiert und das Pellet ein bis zwei Mal mit Saline gewaschen. Danach wurde das Pellet in 50 bis 100 μl Saline so resuspendiert, daß die Bakteriensuspensionen beider Stämme die gleiche Dichte erreichten. Da in einem Konjugationsgemisch etwa drei Mal soviel Rezipienten-Zellen wie Donor-Zellen vorliegen sollten, wurden bei gleichen Suspensionsdichten 30 μl Donor-Stamm- und 80 μl Rezipienten-Stamm-Suspension in einem Eppendorfgefäß gemischt. 100 μl dieses Konjugationsmixes wurden auf eine Agarplatte mit einem für beide Stämme verwendbaren Medium (YEP-Malat-Medium) pipettiert. Um ein Verlaufen der Suspensionsmischung auf der Agarplatte zu vermeiden, wurde schon beim Gießen und Aushärten der Platte eine kleine Auffangmulde mit Hilfe eines Uhrglases erzeugt. Die Konjugationsplatte wurde schließlich über Nacht bei $35\text{ }^\circ\text{C}$ in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Plastikbox aufbewahrt, um das Eintrocknen des Suspensionsgemisches zu verhindern. Am nächsten Tag wurde der Mix mit einer Impföse oder einer Pipette vollständig von der Agarplatte entfernt, in ein Eppendorfgefäß übertragen und in 1 ml Saline suspendiert. Von dieser Suspension wurden mehrere aufeinander

folgende 1:10-Verdünnungen hergestellt, wobei von jeder Verdünnungsstufe (bis 1:10.000) 100 μ l mit einem Drigalskispatel auf Selektivmediumplatten des Rezipienten-Stammes ausplattiert wurden. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden nachfolgend auf die neuen plasmidcodierten Eigenschaften (gfp-Expression) hin untersucht.

2.4.3 Isolierung der Gesamt-RNA

Beim Umgang mit RNA-Proben wurden spezielle Vorsichtsmaßnahmen eingehalten, um die Proben vor dem Abbau durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNAsen) zu schützen. Verwendete Geräte, wie Mörser, Glasflaschen, Metallspatel und Meßzylinder wurden vor dem Gebrauch für mindestens 4 Stunden bei 220 °C inkubiert. Plastikartikel wie Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße wurden zweimal autoklaviert.

Die Gewinnung der Gesamt-RNA aus *A. thaliana* wurde mit dem RNeasy® Plant Mini Kit (Fa. Qiagen) laut mitgeliefertem Protokoll durchgeführt. Für die Aufnahme des in flüssigem Stickstoff gemörserten Pflanzen-Gewebes wurde dabei der im Kit enthaltene RLT-Puffer verwendet. Der Nukleinsäure-Gehalt der RNA-Probe wurde nach der Isolation mit einem Zweistrahlphotometer (Fa. Uvicon) ermittelt. Dazu wurden die Extinktionen bei 260, 280 und 320 nm gemessen. Der Extinktionswert bei 260 nm wurde für die Berechnung der Probenkonzentration herangezogen, wobei eine $OD_{260} = 1$ einem RNA-Gehalt von 40 μ g/ml entspricht. Der Quotient von 260 zu 280 nm wurde für die Bestimmung der Reinheit der RNA berechnet. Ein Wert von 1,7 bis 2 entspricht einer hohen Reinheit. Eine Extinktion bei 320 nm deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine hin. Die Proben wurden schließlich bis zur Weiterverarbeitung bei -85 °C eingefroren.

2.4.4 Northern-Blot-Analyse

2.4.4.1 RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität der RNA („Probe-Gel“) oder für einen Northern-Blot („Blot-Gel“) wurde die Gesamt-RNA (2.4.3) in einem Gel aufgetrennt. Für ein Probe-Gel wurden dazu 1 bis 2 μ l einer RNA-Probe mit 4 bzw. 3 μ l DEPC-Wasser und 5 μ l Ethidiumbromid-haltigem RNA-Probenpuffer (2.3) gemischt und auf ein Formaldehyd-Gel aufgetragen (2.3, RNA-Gel). Nach dem Lauf wurde die Qualität der RNA unter UV-Beleuchtung kontrolliert. Hierbei zeigte das Auftreten von zwei klar abgrenzbaren Banden (ribosomale RNA) im Gel, daß die RNA-Moleküle nicht degradiert, d. h. durch RNAsen abgebaut wurden. Für ein Blot-Gel wurden 15 μ g Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden dazu im Verhältnis 1:1 mit RNA-Probenpuffer ohne Ethidiumbromid versetzt. Das Volumen der aufzutragenden Probe und damit auch die Dicke des Gels hingen von der Konzentration der jeweiligen Probe ab. Die Spannung wurde auf 3 bis 4 V pro cm Abstand zwischen den Elektroden eingestellt.

2.4.4.2 Northern-Blot

Um die aufgetrennte Gesamt-RNA einer Autoradiographie (2.4.4.5) unterziehen zu können, wurde die RNA im Rahmen eines Northern-Blots auf eine Nylon-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst zweimal für 10 min in 10x SSC-Puffer inkubiert. Der allgemeine Aufbau des Northern-Blots folgte dann dem in Abbildung 2.1 dargestellten Schema. In eine mit 10x SSC-Puffer gefüllte Glasschale wurde das umgedrehte Geltablett (Steg) aus der Elektrophorese-Apparatur gesetzt. Über den Steg wurde eine Filterpapier-Brücke in der Breite des Gels gelegt, so daß die Enden des Filterpapiers in den Puffer tauchten. Auf die Brücke wurden nun zwei in Gelgröße geschnittene und mit 10x SSC getränkte Filterpapiere, dann das Gel selbst mit der Oberseite nach unten und die ebenfalls mit 10x SSC angefeuchtete Nylonmembran gelegt. Dabei wurden die Luftblasen unterhalb des Gels zu den Seiten hin herausgestrichen und das Gel selbst mit 2 bis 3 ml 10x SSC-Puffer befeuchtet. Auf die Membran folgten dann drei Lagen Filterpapier in Gelgröße (trocken oder befeuchtet), ein etwa 15 bis 20 cm hoher Stapel an Papiertüchern sowie ein den Aufbau beschwerendes Gewicht von 300 bis 400 g. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht (16 bis 20 Stunden). Nach dem Abbau des Blots wurden auf der Nylonmembran die Taschen des Gels markiert und die rechte untere Ecke als Seitenmarkierung abgeschnitten. Danach wurde die Membran für 10 min bei 60 °C inkubiert, um Reste von Formaldehyd zu entfernen, und abschließend mit UV-Licht bestrahlt (0,8 J/cm²), um die RNA auf der Nylon-Membran zu fixieren (*cross linking*). Die Membran wurde bei -20 °C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

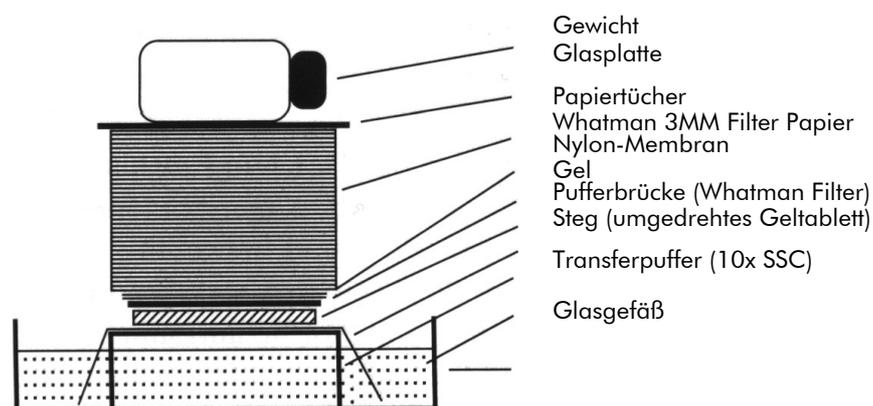


Abb. 2.1

Schematische Darstellung des Aufbaus eines Northern-Blots.

2.4.4.3 Radioaktive Markierung der AtKC1- bzw. 18S-rRNA-Sonde

Zum Nachweis der mRNA bestimmter exprimierter Gene auf der geblotteten Nylon-Membran (2.4.4.2) wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet. Dies sind i. d. R. DNA-Fragmente des nachzuweisenden Gens, die sich in ihrer Basensequenz komplementär zu der auf der Nylon-Membran fixierten mRNA-Sequenz verhalten. Die markierte DNA-Sonde bindet beim Hybridisierungsvorgang (2.4.4.4) an die fixierte mRNA und bildet mit ihr ein DNA/RNA-Hybrid. Aufgrund der radioaktiven Markierung ist dieses Hybrid dann detektierbar (2.4.4.5). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Genfragment des K⁺-Kanals AtKC1 eingesetzt. Um die auf der Nylon-Membran gebundene AtKC1-mRNA korrekt zu quantifizieren, wurde die Membran auch mit einem Kontroll-Gen, dem 18S-rRNA-Fragment aus *Arabidopsis thaliana*, hybridisiert. Die 18S-rRNA gilt als konstant exprimiert und hat daher, unabhängig vom Gewebe, stets den gleichen Anteil in einer Gesamt-RNA. Dadurch ist eine Normalisierung der AtKC1-mRNA-Signale und deren Vergleich möglich.

Für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde zunächst jeweils ein Plasmid mit dem Fragment des K⁺-Kanals AtKC1 bzw. der 18S-rRNA (2.1.3) in den *E. coli* DH5 α -Stamm (2.1.2) transformiert (2.4.2.4) und anschließend in den Bakterien amplifiziert (2.4.2.1). Aus einer über Nacht gewachsenen *E. coli* DH5 α -Kultur wurde dann das jeweilige Plasmid isoliert. Die Isolierung folgte dem Protokoll des Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System-Kit (Fa. Promega). Nach der Isolierung wurde die Plasmidkonzentration am Zweistrahlphotometer bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einem DNA-Gehalt von 50 μ g/ml. Um das 2,1 kb große DNA-Fragment des K⁺-Kanals AtKC1 aus dem Plasmid pGEMHE herauszuschneiden, wurden 2 bis 2,5 μ g Plasmid mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das Plasmid pBS II KS \pm 18S-rRNA wurde mit EcoRI behandelt. Die Restriktionsenzyme wurden von der Fa. Boehringer mit den entsprechenden Puffern bezogen. Um das Fragment vom Rest-Plasmid zu trennen, wurde der Restriktionsansatz mit DNA-Probenpuffer (Fa. Promega, Ladepuffer 6x) versetzt (2 μ l PP pro 10 μ l Ansatz) und in einem TBE-Gel (2.3) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung der Größe des herausgeschnittenen Fragments erfolgte der Lauf zusammen mit einem Größenmarker (Fa. Peqlab, DNA Sizer V). Nach dem Gellauf wurde die Fragment-Bande unter UV-Beleuchtung identifiziert und aus dem Gel geschnitten. Anschließend wurde das Gewicht des Gelstücks ermittelt und das Fragment gemäß Anweisung des Jetsorb DNA Extraction Kit (Fa. Genomed) aus dem Gel eluiert. Abschließend wurden Reinheit und Konzentration des Fragments mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft. Der Lauf wurde daher zusammen mit einem Größen- und Mengenmarker (Fa. Eurogentec, Smartladder) durchgeführt. Die radioaktive Markierung des AtKC1- bzw. 18S-rRNA-DNA-Fragments erfolgte mit Hilfe von [α -P³²]dCTP und der Ready-to-go[™] DNA Labelling Beads (-dCTP) der Fa. Amersham Pharmacia Biotech. Der lyophilisierte Reaktionsmix wurde dazu mit Wasser versetzt und zum Auflösen ca. 60 min im Eisbad inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 150 μ g des AtKC1-

Fragments für 5 min bei 90 °C inkubiert, um die DNA-Doppelhelix aufzubrechen (Denaturierung). Im Eisbad wurde das DNA-Fragment zu dem Reaktionsmix pipettiert und mit 5 µl [α -P³²]dCTP-Lösung versetzt (2 MBq, Spezifische Aktivität; 110 TBq/mmol). Anschließend wurde der Mix bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach 45 min durch die Zugabe von 150 µl TE-Puffer (2.3) gestoppt. Nicht eingebautes [α -P³²]dCTP und sehr kurze Fragmente wurden durch Aufreinigen des Mixes entfernt. Hierzu wurde zunächst eine Mobicol-Säule (Fa. MobiTec) mit in sterilem Wasser suspendierten Sephadex G50 (Fa. Sigma) befüllt und mit TE-Puffer gespült. Der Reaktionsmix wurde anschließend in die Säule pipettiert und mit Hilfe einer Einwegspritze durch die Säule in ein Eppendorfgefäß gedrückt. Das aufgereinigte Eluat wurde für die Hybridisierung benutzt.

2.4.4.4 Hybridisierung

Vor dem Einsatz der radioaktiven Sondenfragmente wurde die Nylon-Membran in einem Hybridisierungssofen für zwei Stunden in 25 ml Hybridisierungspuffer (2.3) bei 68 °C inkubiert (Prähybridisierung). Die Prähybridisierung dient der Absättigung der Membran mit dem im Puffer enthaltenen BSA und verhindert somit eine unspezifische Bindung der Sonden auf der Membran. Anschließend wurde der Puffer durch 25 ml frischen Hybridisierungspuffer ersetzt und mit jeweils einer der markierten Sonden versetzt. Vor der Zugabe wurden die Sonden für 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz im Eisbad abgekühlt. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte über Nacht bei 68 °C. Am nächsten Tag wurden die Membranen dann zwei- bis dreimal für je 20 min bei 68 °C mit Hybridisierungspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Zwischen den Waschsritten wurde die Aktivität der Membranen mit einem Handmonitor überprüft. Abschließend wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und, wie in Abschnitt 2.4.4.5 beschrieben, weiterbehandelt.

Nach der Detektion der AtKC1-Signale (2.4.4.5) wurde die Nylon-Membran für die Hybridisierung mit der 18S-rRNA vorbereitet. Zum Entfernen (*stripping*) der radioaktiv markierten AtKC1-Sonde wurde die Membran für 20 min in kochendem destillierten Wasser inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis mit einem Handmonitor auf der Membran keine Radioaktivität mehr detektiert werden konnte. Anschließend wurde die Membran mit der 18S-rRNA-Sonde wie oben beschrieben hybridisiert.

2.4.4.5 Autoradiografie mit dem Phosphoimager

Die Detektion der radioaktiven Signale wurde mit einem Phosphoimager (Fa. Fuji, BAS-1000) am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover durchgeführt. Auswertung und Quantifizierung der Signale erfolgte mit der zu dem System gehörenden Bearbeitungssoftware *ImageReader* und dem Analyseprogramm *MacBAS*. Die eingeschweißten Membranen (2.4.4.4) wurden dazu auf eine frisch

gelöschte Imagerplatte (Fa. Fuji, BAS-MS Imaging Plate) gelegt, in einer Filmkassette verschlossen und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde die sensitive Oberfläche der Imagerplatte durch die radioaktive Strahlung der hybridisierten Sonden angeregt. Der Grad der Anregung wurde dann durch den Phosphoimager detektiert und an die Analysesoftware übertragen. Diese berechnete schließlich die Signalstärke der Proben.

2.4.5 Expressionsanalyse mit dem LightCycler-System

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden Analysen mit dem LightCycler-System (Fa. Roche) am Institut für Botanik der Universität Würzburg durchgeführt. Dieses System beruht auf dem Prinzip der PCR, wobei die Amplifikation der DNA gemessen und quantifiziert werden kann. Das Gerät ist ein Thermocycler, kombiniert mit einem Fluorimeter und einem PC, so daß *real-time*- und *online*-Messungen möglich sind. Das LightCycler-System erlaubt es, mit Hilfe eines Fluoreszenz-Farbstoffes die Amplifikation von DNA-Molekülen nach jedem PCR-Zyklus zu messen. Die Detektion der DNA erfolgt dabei durch den Farbstoff SYBR Green I, der während eines Zyklus in den DNA-Doppelstrang (dsDNA) reversibel eingebaut wird und bei 530 nm fluoresziert. Ab einem bestimmten PCR-Zyklus, der von der Anfangskonzentration der nachzuweisenden cDNA in der Probe abhängig ist, erreicht die amplifizierte Menge die logarithmische Phase. Dabei weist das Erreichen dieser Phase in einem frühen Zyklus auf eine hohe cDNA-Ausgangskonzentration hin, während ein späterer Eintritt in die logarithmische Phase auf eine geringe Menge an cDNA schließen läßt. Für die Quantifizierung der DNA ist demnach der Zyklus entscheidend in dem die logarithmische Phase erreicht wurde und nicht die am Ende einer PCR erreichte DNA-Menge. Auf diese Weise korreliert die Intensität der Fluoreszenz direkt mit der Anzahl an dsDNA-Molekülen in der Ausgangsprobe. Für die Analysen am LightCycler mußte aus den Gesamt-RNA-Proben (2.4.3) der mRNA-Anteil isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Die folgenden Abschnitte erläutern die Vorgehensweise bei den LightCycler-Analysen.

2.4.5.1 Isolierung von mRNA

Die Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA (2.4.3) erfolgte mit dem *Dynabeads Purification Kit* (Fa. Dynal) bestehend aus der Dynabeads-Suspension, 2x Binding Buffer, Waschlösung und Elutionspuffer. Um die mRNA von eventuellen DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde das mitgelieferte Protokoll modifiziert durchgeführt, und die RNA einer zweifachen Aufreinigung unterzogen. Dafür wurden 50 µl Dynabeads-Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gefäß wurde dann bis zur Klärung der Suspension in den Magnethalter (MPC) gestellt, damit der Überstand abpipettiert werden konnte. Anschließend wurden die Dynabeads im Rahmen eines Wasch-Schrittes in 100 µl 2x Binding Buffer resuspendiert und der Überstand nach Klärung der Suspension im MPC erneut abpipettiert. Die Gesamt-

RNA-Probe wurde verdünnt, so daß sich in 50 μ l 15 bis 20 μ g RNA befanden. Um Sekundärstrukturen aufzubrechen, wurde die verdünnte RNA-Probe zunächst für 2 min bei 65 °C inkubiert, im Eisbad gekühlt und mit 50 μ l 2x Binding Buffer versetzt. In dieser Suspension wurden anschließend die gewaschenen Dynabeads resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Schüttler inkubiert, damit die mRNA an die Dynabeads binden konnte (Schritt 1). Danach wurde der Überstand im MPC entfernt und die Dynabeads zweimal mit 100 μ l Waschpuffer gewaschen (Schritt 2). Um die mRNA von den Dynabeads wieder zu lösen, wurden 50 μ l Elutionspuffer auf die Beads gegeben und für 2 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurden erneut 50 μ l 2x Binding Buffer hinzugefügt und die o. g. Schritte 1 und 2 wiederholt. Abschließend wurden die Dynabeads mit nur 10 μ l Elutionspuffer (oder RNase-freiem Wasser) versetzt und für 2 min bei 80 °C inkubiert. Nach Klärung der Suspension im MPC wurde der Überstand in ein RNase-freies Eppendorfgefäß überführt.

2.4.5.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) wird mRNA als Template genutzt, um mittels einer reversen Transkriptase einzelsträngige DNA (cDNA) zu erzeugen. Im Gegensatz zu einer PCR werden hierbei die Moleküle nicht amplifiziert, sondern es entsteht pro mRNA-Molekül ein Molekül cDNA. Mit dieser cDNA lassen sich dann Expressionsanalysen am LightCycler durchführen. Pro RT-Ansatz wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

6,7 μ l Template-mRNA, 0,4 μ l RT-Primer (Fa. Sigma, ARK Poly T-Primer), 0,5 μ l 10 mM dNTPs (Fa. Promega, PCR Nucleotide Mix 10 mM) und 2,0 μ l 5xRT-Puffer (Fa. Promega) wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, für 2 min bei 70 °C inkubiert, kurz anzentrifugiert und im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 0,4 μ l reverser Transkriptase (Fa. Promega, M-MLV RT, RNase H[-] Point Mutant 200 U/ μ l,) wurde der Ansatz dann für eine Stunde bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die cDNA bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

2.4.5.3 Vorbereitung der cDNA-Proben für den LightCycler

Die Analysen wurden mit den Reagenzien des *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I*-Kit (Fa. Roche) durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden zuvor 1:20 verdünnt. Pro PCR-Ansatz wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert: 2 μ l Probe (verdünnt), 2 μ l Enzym-Mix (*LC-FastStart Reaction Mix SYBR Green I*, enthält die Polymerase) und 16 μ l Primer-Mix für das nachzuweisende Fragment. Der Primer-Mix bestand aus 670 bzw. 660 μ l H₂O, 120 μ l 25 mM MgCl₂, 5 bzw. 10 μ l 50 μ M Antisense-Primer und 5 bzw. 10 μ l 50 μ M Sense-Primer. Der Ansatz wurde in LightCycler-Kapillaren pipettiert, kurz anzentrifugiert und in das Probenkarussell des LightCyclers eingesetzt. Die Sequenzen der Sense- und Antisense-Primer sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1

Verwendete Primer für die Amplifikation am LightCycler (nach Szyroki *et al.*, 2001; Ache, pers. Mitteilung). Angegeben sind außerdem die Größe der Fragmente und die Anzahl der Moleküle pro Femtogramm.

Name des Gen-Fragments	Sense Primer	Antisense Primer	Größe des Fragments [bp]	Moleküle/fg
Aktin 2/8	5'-GGT GAT GGT GTG TCT-3'	5'-ACT GAG CAC AAT GTT AC-3'	435	2092
AtKC1	5'-ATA TTG CGA TAC ACA AG-3'	5'-GAC CTA ACT TCG CTA AT-3'	373	2440
AKT1	5'-CCA ACT GTT GCG TAT-3'	5'-CTG CGT GGT ACT CC-3'	347	2623
AKT2/3	5'-AAA ATG GCG AAA ACA C-3'	5'-CGC TGC TTC ACA TAG AA-3'	353	2578
KAT1	5'-ACT TCC GAC ACT GC-3'	5'-CCCAA TGA CAT CTA A-3'	379	2401
GORK	5'-CCT CCT TTA ATT TAG AAG-3'	5'-GCT CCA TCC GAT AG-3'	496	1835
SKOR	5'-TGA AAC GGC TTC TTA-3'	5'-GAG CCA CTC GGA AAC-3'	253	2146
KCO1	5'-GTT GGC ACG ATT TTC-3'	5'-GCT TCG CAA GAT GAT-3'	500	1820
KCO5	5'-AGA CGA CAA AGA AGA-3'	5'-CCG GTG AGA ATC ATA-3'	456	1995

2.4.5.4 PCR-Bedingungen

Vor dem Start des ersten PCR-Zyklus wurde die Polymerase aktiviert. Dazu wurde die Probe einmalig bei jedem LightCycler-Lauf für 10 min bei 95 °C inkubiert. Die eigentliche PCR hatte dann 45 Zyklen. Im ersten Schritt eines Zyklus wurde die doppelsträngige DNA bei 95 °C denaturiert, wobei die Aufheizphase des Gerätes von etwa einer Sekunde für die Denaturierung des geringen Probe-Volumens in der Kapillare ausreichte. Für weitere sieben Sekunden folgte dann der Annealing-Schritt bei 50 °C. Da in jedem LightCycler-Lauf i. d. R. die Expression mehrerer Gene getestet wurde, wurden die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primer (Tab. 1) an einen einheitlichen Wert angepaßt. Der abschließende Verlängerungsschritt dauerte 21 Sekunden bei 72 °C. Vor der Fluoreszenzmessung wurde die Probe nach jedem Zyklus für 5 Sekunden auf 80 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu zerstören, die die Messung beeinflussen würden.

2.4.5.5 Schmelzkurve

Nach dem letzten PCR-Zyklus wurden die amplifizierten Produkte untersucht, um sicherzustellen, daß die Primer spezifisch gebunden hatten, und daß es sich tatsächlich um die nachzuweisenden Gene handelte. Aus diesem Grund wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, bei der die spezifische Schmelztemperatur des doppelsträngigen DNA-Fragments bestimmt wurde. Für jedes DNA-Fragment gibt es eine spezifische Temperatur bei der 50% aller Doppelstränge in zwei Einzelstränge aufgespalten wurden („Schmelzen“). Die spezifische Schmelztemperatur wird dabei hauptsächlich durch den G/C-Gehalt und die Länge des Fragments bestimmt. Zur

Analyse der Schmelztemperatur mit dem LightCycler wurden die Proben in 1° C-Schritten von 80 auf 95 °C erhitzt, wobei nach jeder Temperatur-Erhöhung die Fluoreszenz der Probe gemessen wurde. Anders als bei der vorangegangenen PCR nimmt bei dieser Analyse die Fluoreszenzintensität stark ab, da mit steigender Temperatur immer mehr DNA-Stränge auseinanderbrechen und den reversibel eingebauten Farbstoff (2.4.5) wieder freigeben.

2.4.5.6 Auswertung der Meßdaten (Quantifizierung)

Um die Daten verschiedener LightCycler-Läufe vergleichen zu können, wurden alle gemessenen Werte auf ein Kontrollgen (Positivkontrolle) bezogen. Bei *Arabidopsis thaliana* wurden dafür die Aktine 2 und 8 (Aktin2/8) genutzt. Diese Aktine machen etwa 80% des Gesamt-Aktins einer *Arabidopsis*-Zelle aus. Der Gehalt ist in einer Gewebeart, wie z. B. in der Wurzel konstant und läßt sich deshalb für Quantifizierungen als Kontrollgen heranziehen. Für eine Quantifizierung wurden die LightCycler-Meßdaten in Molekülzahlen umgerechnet und dann auf 10.000 Moleküle der Aktine 2/8 bezogen. Die Meßdaten des LightCyclers sind in Femtogramm [fg] angegeben. Ein Femtogramm entspricht 910 Molekülen eines 1 kb langen Fragments. Da das für den Abgleich verwendete Aktin 2/8-Fragment eine Länge von 435 bp hat (Tab. 1), ergibt sich hierfür ein Wert von 2092 Molekülen Aktin/fg. 10000 Moleküle Aktin 2/8 wiegen demnach 4,78 fg. Für jedes nachzuweisende Gen mußte ebenfalls die Molekülanzahl/fg bekannt sein. Zur Berechnung der Molekülzahl wird die Länge des amplifizierten Gens benötigt (Tab. 1). Die Umrechnung in Molekülzahlen erfolgte wie in Formel a.) beschrieben und ist ebenfalls in Tabelle 1 angegeben.

$$a.) \frac{1000 \text{ bp}}{\text{Fragmentlänge des nachzuweisenden Gens [bp]}} \cdot 910 = \text{Moleküle/1 fg}$$

Für jede Probe mußte ein Aktin-Faktor ermittelt werden. Dieser diente der Umrechnung der Proben-Meßwerte. Der Aktin-Faktor wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet.

$$b.) \frac{4,78 \text{ fg} (\cong 10.000 \text{ Molekülen Aktin})}{\text{gemessenes Aktin (Probe) [fg]}} = \text{Faktor (F}_{\text{Act}})$$

Mit dem Faktor ließen sich Molekülmengen in den Proben nach Formel c.) ermitteln.

$$c.) \text{ Moleküle (Probe)/10000 Mol. Actin} = F_{\text{Act}} \cdot \text{Meßwert d. Probe [fg]} \cdot \frac{\text{Moleküle}}{1 \text{ fg}}$$

3 Ergebnisse

Anhand des Modellsystems *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum brasilense* sollen Einblicke in die Mechanismen gewonnen werden, die an der Assoziation von Azospirillen und ihren Wirtspflanzen beteiligt sind. Dubrovsky *et al.* haben bereits 1994 von einer Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum brasilense* berichtet. So wurde nach einer drei- bis fünf-tägigen Inkubation ein wachstumsfördernder Effekt der Azospirillen auf die Wurzelhaare von *Arabidopsis* festgestellt. Die Wurzellänge der Pflanzen zeigte sich dagegen von der Inokulation unbeeinflusst. In dieser Studie wurde allerdings das Kolonisierungsverhalten der Azospirillen auf der *Arabidopsis*-Wurzel nicht detailliert beschrieben. Auch über die Vorgänge auf molekularer Ebene im Zuge einer Assoziation zwischen Azospirillen und *Arabidopsis thaliana* ist bisher nichts bekannt.

3.1 Exsudatuntersuchungen

Um Einblicke in das Kolonisierungsverhalten der Azospirillen zu erlangen, wurde zunächst das Exsudatmuster von *Arabidopsis thaliana* sowie von Mischkulturen aus Pflanzen und Bakterien untersucht. Dies sollte klären, ob *Arabidopsis thaliana* Substanzen exsudiert, die von Azospirillen verwertet werden können und somit als chemotaktische Attraktanten auf die Bakterien wirken. Analysiert wurden die Medienüberstände drei bis vier Wochen alter pflanzlicher Rein- (2.4.1.5) bzw. 44 bis 48 Stunden alter Mischkulturen (2.4.1.5). Die Überstände wurden auf verschiedene organische Stoffgruppen wie Zucker, organische Säuren und Aminosäuren hin untersucht. Die Analysen wurden freundlicherweise in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. W. Kaiser am Julius-von-Sachs-Institut in Würzburg durchgeführt. Es zeigte sich allerdings, daß die im Pflanzenanzuchtmedium ($MS^{1/2}$ -Grundmedium, 2.2) enthaltene Saccharose die Messungen störte, so daß eine starke Verdünnung der Proben (1:100) notwendig war. Dies bewirkte jedoch, daß die detektierten Stoffe nur in Spuren nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund war eine quantitative Auswertung der Ergebnisse nicht möglich. Daher sind die Exsudat-Ergebnisse als rein qualitative Analyse zu verstehen. Bei der Zuckeranalyse der pflanzlichen Reinkulturen konnten Mannit und Arabinose, bei den organischen Säuren Malat und bei den Aminosäuren Aspartat und Glutamat nachgewiesen werden. In den Überständen der Mischkulturen konnten dagegen keine Substanzen detektiert werden.

3.2 Kolonisierung der *Arabidopsis-thaliana*-Wurzel durch *Azospirillum brasilense spec.*

3.2.1 Untersuchung des Kolonisierungsverhaltens mit Hilfe des GUS-Reportersystems

In einem nächsten Schritt sollte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer geprüft werden, ob Azospirillen die Wurzel von *Arabidopsis thaliana* dauerhaft besiedeln und damit ein essentieller Schritt beim Aufbau einer Assoziation stattfindet. Um das Kolonisierungsverhalten von *Azospirillum brasilense* mit *Arabidopsis thaliana* als Wirtspflanze im zeitlichen Verlauf zu ermitteln, wurden drei Wochen alte Schüttelkulturen aus *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen (2.4.1.5) mit *Azospirillum brasilense* Sp7 pFAJ 31.13 inokuliert. Dieser *Azospirillum*-Stamm enthält eine konstitutiv exprimierte *A. brasilense*-Promotor::*gusA*-Fusion. Das GUS-Reportersystem gewährleistet, daß während des Bakterienwachstums das Enzym β -Glucuronidase (*gusA*) unter der Kontrolle eines *A. brasilense*-Promotors exprimiert wird. Die Aktivität des Enzyms läßt sich mit dem Substrat X-GlcA nachweisen, dessen Umsetzungsprodukt ein blauer Farbstoff ist. Die Spezifität der GUS-Reportersysteme beruht darauf, daß sowohl das Enzym als auch das Substrat natürlicherweise nicht in Azospirillen und *Arabidopsis*-Pflanzen vorkommen. Die durch die β -Glucuronidase-Aktivität verursachte Blaufärbung kann daher als Nachweis einer Kolonisierung der Wurzel durch den *Azospirillum*-GUS-Reporterstamm herangezogen werden. Ein Nachteil dieses Systems lag allerdings darin, daß sich einzelne Bakterienzellen nicht abbilden ließen, da GUS-Stämme in der Regel eine diffuse Färbung verursachen.

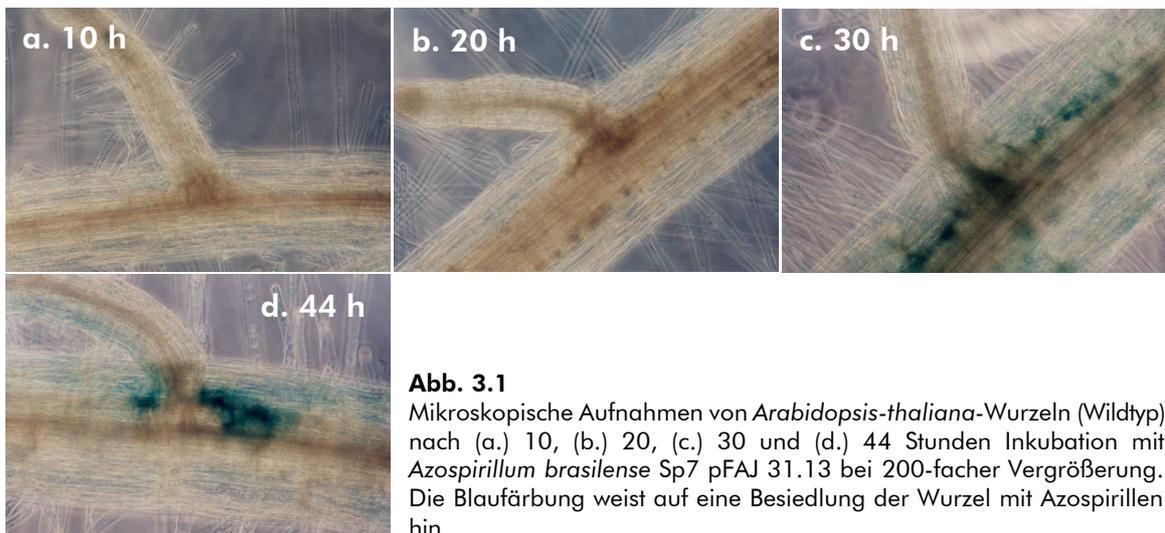


Abb. 3.1

Mikroskopische Aufnahmen von *Arabidopsis-thaliana*-Wurzeln (Wildtyp) nach (a.) 10, (b.) 20, (c.) 30 und (d.) 44 Stunden Inkubation mit *Azospirillum brasilense* Sp7 pFAJ 31.13 bei 200-facher Vergrößerung. Die Blaufärbung weist auf eine Besiedlung der Wurzel mit Azospirillen hin.

Die Ernte der mit Azospirillen inokulierten Pflanzen erfolgte nach 10, 20, 30 und 44 Stunden. Die Pflanzen wurden zweimal mit Saline ab gespült, um die nicht-wurzeloassoziierten Azospirillen zu entfernen. Nach Übernachts-Inkubation in der GUS-Färbelösung (2.3) erfolgte die Auswertung der Proben. Nach 10 bzw. 20 Stunden Inkubation konnte bei keiner der Proben eine Blaufärbung nachgewiesen

werden (Abb. 3.1, Fotos a. und b.). Die ersten β -Glucuronidase-Aktivitäten und somit auch die ersten fest auf der Wurzeloberfläche verankerten Bakterien zeigten sich erst 30 Stunden nach Beginn der Inkubation (Abb. 3.1, Foto c.). Während sich jedoch die Färbung auf der Wurzeloberfläche nach 30 Stunden nur diffus darstellte, zeigte sich nach 44 Stunden eine deutlich intensivere Färbung vor allem an den Ausbruchstellen von Seitenwurzeln (Abb. 3.1, Foto d.). Die sonstige Wurzeloberfläche war auch nach der längeren Inkubationszeit nur vereinzelt schwach gefärbt, und es deuteten sich erstmals blau gefärbte Wurzelhaare an.

3.2.2 Kolonisierungsnachweis mit dem GFP-Reportersystem

Um genaueren Aufschluß über das Besiedlungsverhalten einzelner wurzelassoziiierter Bakterien zu erhalten, wurde eine *Azospirillum*-Mutante erzeugt, die das *green fluorescent protein* (GFP) konstitutiv exprimiert. Dabei wurde das Plasmid p519ngfp (2.1.3), auf dem das GFP-Protein codiert ist, mittels Konjugation in den *Azospirillum brasilense* Sp7-Wildtyp-Stamm eingeschleust (2.4.2.5). Wie die im Abschnitt 3.2.1 erwähnte β -Glucuronidase kommt auch das *green fluorescent protein* nicht natürlicherweise in *Azospirillen* und *Arabidopsis thaliana* vor und ist deshalb ein spezifisches Reportersystem.

In Anlehnung an die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1 wurden auch hier drei Wochen alte Pflanzen einer Schüttelkultur (2.4.1.5) verwendet. Die Auswertung der Wurzelkolonisierung mit *Azospirillum brasilense* Sp7 p519ngfp erfolgte nach 44-stündiger Inkubation. Die nach der Ernte zweimal mit Saline abgespülten Wurzeln wurden sowohl bei Weiß-Licht als auch bei Blau-Licht (488 nm) mikroskopiert (2.4.1.5). Die Fotos belegen einerseits den Erfolg der *Azospirillum*-Konjugation (2.4.2.5) und andererseits die einzellgenaue Auflösung *gfp*-exprimierender Bakterien (Abb. 3.2). Das Kolonisierungsmuster entspricht dem Ergebnis der GUS-Färbung: grün-fluoreszierende Bakterien ließen sich vermehrt an der Basis der *Arabidopsis*-Seitenwurzeln nachweisen (Abb. 3.2, Fotos a. und b.) und waren auch vereinzelt auf der Wurzeloberfläche zu finden. Des weiteren konnte *Azospirillum brasilense* deutlich auf den Wurzelhaaren nachgewiesen werden (Abb. 3.2, Fotos c. und d.).



Abb. 3.2

Mikroskopische Aufnahmen der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* nach 44-stündiger Inkubation mit *Azospirillum brasilense* Sp7 p519ngfp (400-fache Vergrößerung). Die grün-fluoreszierenden Punkte (weiße Pfeile) repräsentieren die Bakterien. Fotos (a.) und (b.) zeigen eine Gruppe von *Azospirillen* in der Nähe einer Seitenwurzel (schwarze Pfeile [a.]). Fotos (c.) und (d.) zeigen ein besiedeltes *Arabidopsis*-Wurzelhaar. (a./c. Weiß-Licht; b./d. Blau-Licht)

3.3 Morphologie von *Arabidopsis thaliana* nach Inkubation mit *Azospirillum brasilense* spec.

Um eventuelle Veränderungen des Pflanzenwachstums im Zuge der Assoziation von *Azospirillum brasilense* und *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen 14 Tage mit unterschiedlichen *Azospirillum*-Stämmen inkubiert. Die Behandlung und Inokulation der Pflanzen erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1.2 beschrieben. Als Inokulum wurden neben dem Wildtyp-Stamm *Azospirillum brasilense* Sp7 auch Stämme verwendet, die einen Defekt in der Auxin-Synthese aufwiesen (2.1.2). Während Stamm SpM7918 nur 10% des konstitutiven Wildtyp-IAA-Levels produziert, scheidet Stamm FT326 10 bis 30 mal mehr Auxin als der Wildtyp aus. Auch auf Seiten der Pflanze wurde nicht nur der Wildtyp (WT) von *Arabidopsis thaliana* verwendet, sondern außerdem noch drei *knock-out*-(Verlust)-Mutanten, die jeweils einen Defekt bei einem in der Wurzel lokalisierten membranintegralen Transportsystem aufwiesen (2.1.1). Der AtKC1-Verlust-(k.o.)-Mutante fehlt der funktionelle K⁺-Aufnahmekanal AtKC1, der K⁺-Ionen aus dem Apoplasten in den Symplasten aufnimmt. Die SKOR-Verlust-(k.o.)-Mutante ist in der Expression des K⁺-Abgabekanals SKOR gestört, der K⁺-Ionen aus dem Symplasten an das Xylem abgibt. Die AUX1-Verlust-(k.o.)-Pflanzen schließlich sind nicht in der Lage, extrazellulär verabreichtes Auxin in die Zelle zu schleusen, da dieser Mutante der Influx-Carrier AUX1 fehlt. Die Ergebnisse dieser Morphologieversuche sind in Abbildung 3.3 dargelegt und werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.3.1 Inokulation von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp)

Der inokulierte Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* zeigt, unabhängig vom verwendeten Bakterium (Abb. 3.3, Foto 1b. bis d.), ein deutlich verbessertes Wachstum gegenüber der nicht-inokulierten Kontrolle (Abb. 3.3, Foto 1a.). Dies betrifft sowohl den Sproß der inokulierten Pflanzen, der ein deutlich größeres und farblich stärker gesättigtes Blattwerk aufweist, als auch das Wurzelsystem, das insgesamt dicker und länger ist, eine größere Anzahl an Seitenwurzeln sowie einen üppigeren Besatz an Wurzelhaaren aufweist. Die Kontrollpflanzen ohne Inokulum weisen dagegen einen kleinen Sproß, sehr dünne Hauptwurzeln mit wenigen Seitenwurzeln und eine sehr spärliche Wurzelbehaarung auf. Vergleicht man die Ausprägung der bakteriellen Effekte, so zeigen sich die oben beschriebenen Ergebnisse beim SpM7918-Stamm (Auxin-Hypoproduzierer, Abb. 3.3, Foto 1c.) am stärksten. Hier sind insbesondere die Seitenwurzeln sehr lang, während sie beim *Azospirillum*-Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 1b.) und vor allem beim FT326-Stamm (Auxin-Hyperproduzierer, Abb. 3.3, Foto 1d.) wesentlich gedrungener sind. Die umgekehrte Reihenfolge ergibt sich jedoch bei der Ausprägung des Wurzelhaarbesatzes. Obwohl auch der SpM7918-Stamm im Vergleich zur nicht-inokulierten Kontrolle mehr Wurzelhaare bei *Arabidopsis* erzeugt, zeigen sich in Gegenwart der beiden anderen

Stämme sowohl dichtere als auch z. T. längere Wurzelhaare, die den Wurzelspitzen dadurch ein buschiges Aussehen verleihen (vgl. 3.3.5).

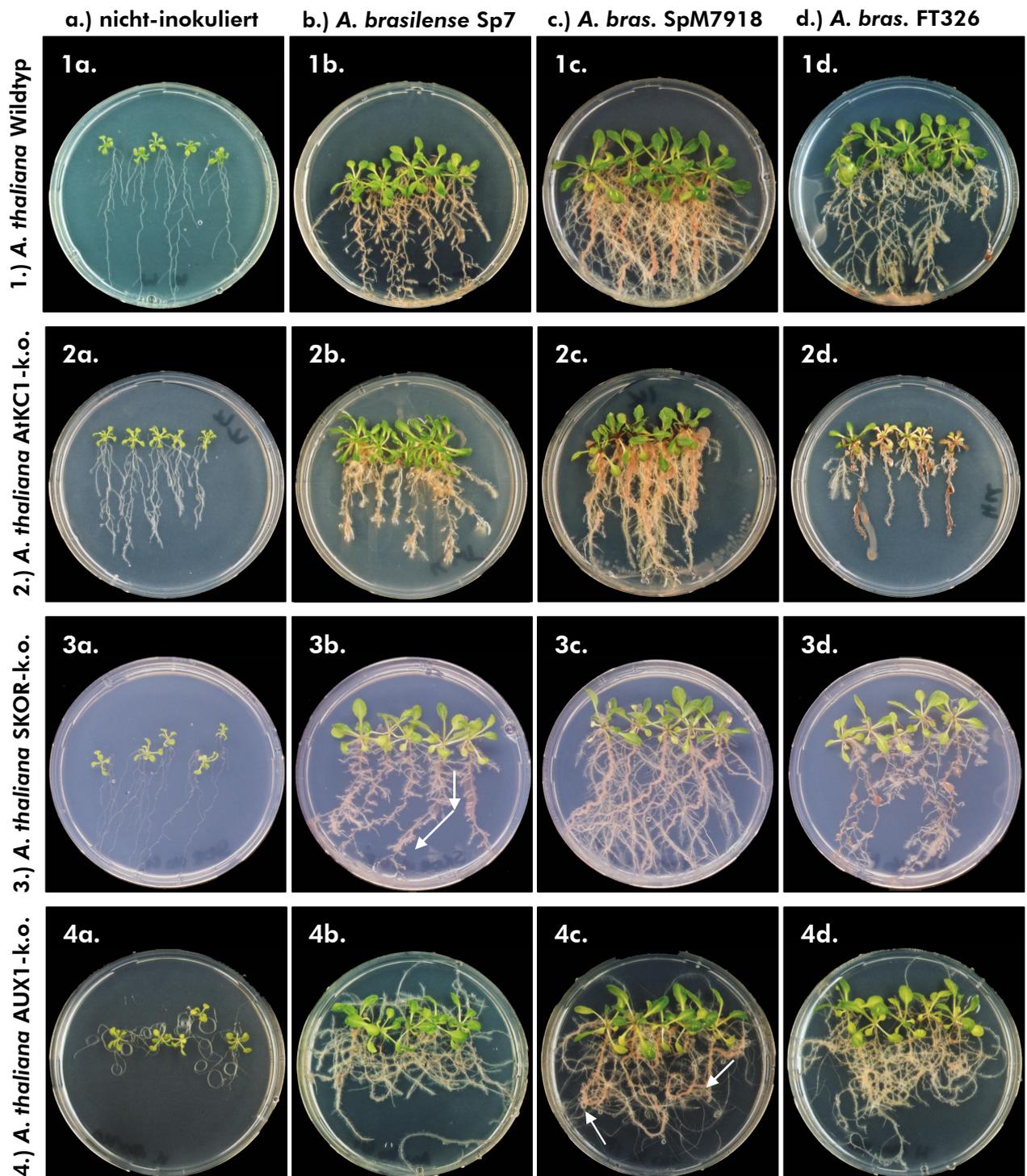


Abb. 3.3

Morphologie von *Arabidopsis thaliana* nach 14-tägiger Inkubation mit *Azospirillum brasilense* spec. Die erste Reihe zeigt die Morphologie des *Arabidopsis*-Wildtyps nicht-inokuliert (1a.) bzw. nach 14-tägiger Inkubation mit *Azospirillum brasilense* Sp7 (1b.), *A. brasilense* SpM7918 (1c.) und *A. brasilense* FT326 (1d.). Die folgenden Reihen zeigen die *A. thaliana* AtKC1-k.o.- (2a. bis d.), SKOR-k.o.- (3a. bis d.) und AUX1-k.o.-Mutante (4a. bis d.) nicht-inokuliert (a.) als auch nach Inkubation mit den verschiedenen *Azospirillum*-Stämmen (b. bis d.). Die weißen Pfeile in Foto 3b. sollen die abgewinkelte Wuchsrichtung der Wurzeln verdeutlichen. Die Pfeile in Foto 4c. zeigen auf Wurzelringel. Der Durchmesser der abgebildeten Agarplatten entspricht 8,5 cm.

3.3.2 Inokulation der *Arabidopsis thaliana* AtKC1-k.o.-Mutante

Bei der AtKC1-k.o.-Mutante von *Arabidopsis thaliana* (Abb. 3.3, Fotos 2a. bis d.) ergab sich durch die Inkubation mit *Azospirillen* ebenfalls ein erkennbarer morphologischer Einfluß auf das Wurzelsystem. Im Gegensatz zum *Arabidopsis*-Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 1a. bis d.) zeigt sich jedoch das Wurzelsystem jeweils kleiner und z.T. noch gedrungener. Dies ist schon bei der nicht-inokulierten Kontrolle sichtbar (Abb. 3.3, Foto 2a.), die eine kürzere Hauptwurzel, dafür jedoch ein etwas kräftigeres und auch stärker verzweigtes Wurzelsystem aufweist. Bei den inokulierten Pflanzen ist es erneut der SpM7918-Stamm (Abb. 3.3, Foto 2c.), der das größte Wurzelsystem bei seiner Wirtspflanze erzeugt, doch bleibt dieses auch hier größtmäßig hinter der entsprechenden Wildtyp-Pflanze (Abb. 3.3, Foto 1c.) zurück, was vor allem auf die wesentlich kürzeren Seitenwurzeln zurückzuführen ist. Dieser „Seitenwurzel“-Effekt wird besonders gut in Gegenwart der beiden anderen Bakterien-Stämme sichtbar. Während der bakterielle Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 2b.) nur sehr kurze Seitenwurzeln erzeugt, sind diese in Gegenwart von FT326 (Abb. 3.3, Foto 2d.) nur im Ansatz zu erkennen, so daß hier nur die gedrungene, aber kräftige Hauptwurzel sichtbar ist. Beim Sproß weisen die mit FT326 inokulierten AtKC1-k.o.-Pflanzen kein wesentlich verbessertes Wachstum auf, während die SpM7918-Mutante und der *Azospirillum*-Wildtyp ein dem pflanzlichen Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 1b. bis c.) vergleichbares Sproßsystem bei der AtKC1-k.o.-Mutante erzeugen. Der Wurzelhaarbesatz ist dagegen vergleichbar mit dem des pflanzlichen Wildtyps.

3.3.3 Inokulation der *Arabidopsis thaliana* SKOR-k.o.-Mutante

Die SKOR-k.o.-Pflanzen (Abb. 3.3, Fotos 3a. bis d.) zeigen sowohl nicht-inokuliert als auch nach der Inokulation mit den verschiedenen *Azospirillum*-Stämmen einen ähnlichen Phänotyp wie der *A.-thaliana*-Wildtyp (Abb. 3.3, Fotos 1a. bis d.). Wurzel- und Sproßhabitus zeigen sich im Wesentlichen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Auffällig ist jedoch, daß die Hauptwurzeln nahezu aller SKOR-k.o.-Pflanzen (inokuliert und nicht-inokuliert) früher oder später leicht abgewinkelt nach unten wuchsen (Abb. 3.3, Foto 3b., weiße Pfeile). Ein solcher Effekt konnte bei den Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 1a. bis d.) nicht beobachtet werden. Des Weiteren wurde bei der SKOR-k.o.-Mutante die Beobachtung gemacht, daß im Gegensatz zu den Wildtyp-Pflanzen einige der inokulierten SKOR-k.o.-Pflanzen nach 21 Tagen Wachstum bereits Blütenbildung zeigten (nicht als Foto gezeigt).

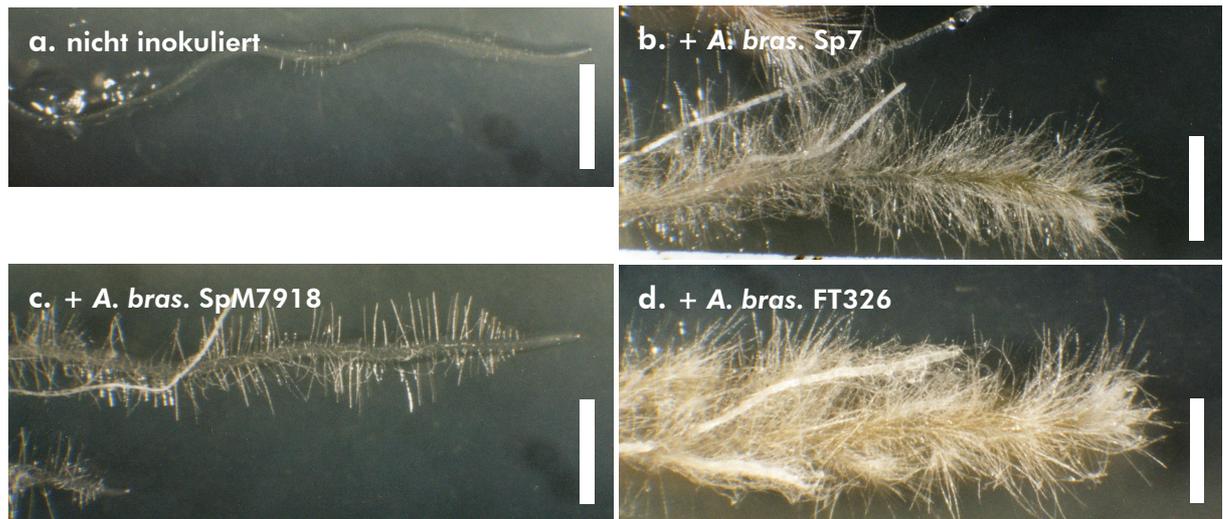
3.3.4 Inokulation der *Arabidopsis thaliana* AUX1-k.o.-Mutante

Das Fehlen des Auxin-Transporters AUX1 verursacht bei dieser Mutante ein agravitropes Wurzelwachstum, d. h., die Wurzelspitzen sind nicht nach unten in Richtung des Bodens gerichtet, sondern sie wählen die Wachstumsrichtung scheinbar zufällig. Dadurch entsteht ein schlaufen- und kringelförmiges Wurzelwachstum, welches besonders bei den nicht-inokulierten Pflanzen deutlich zu erkennen ist

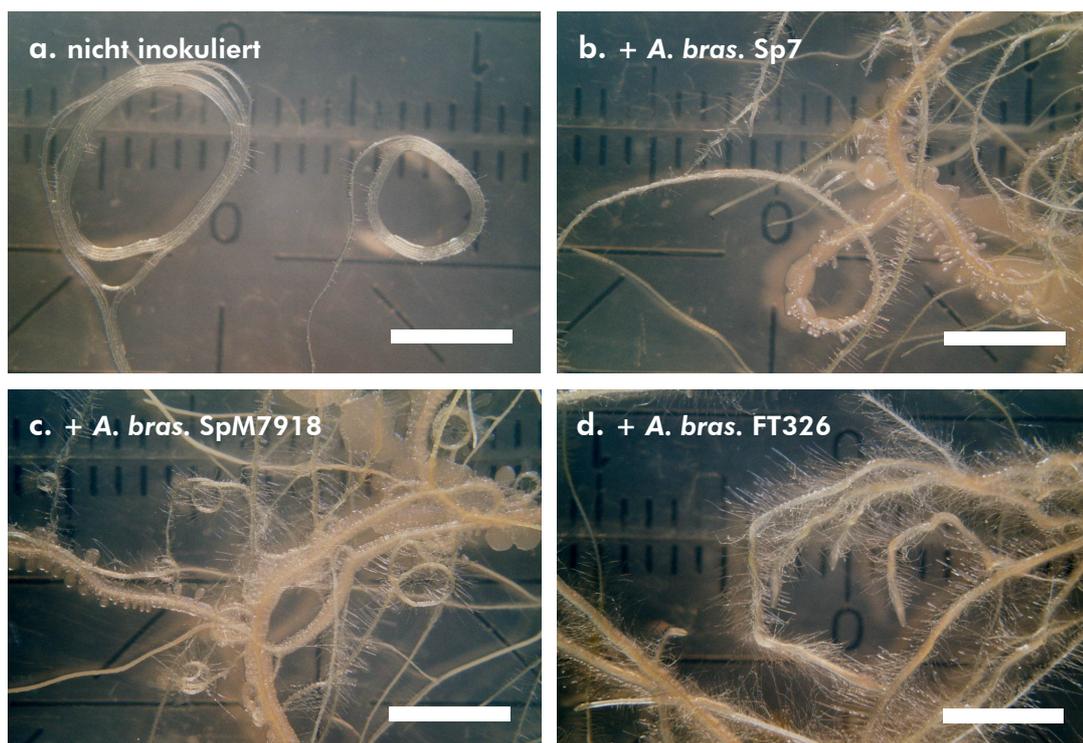
(Abb. 3.3, Foto 4a. und Abb. 3.5, Foto a.). Auch die inokulierten Pflanzen zeigen ein agravitropes Wachstum, wobei jedoch die Wurzelkringel wesentlich schwächer ausgeprägt sind (Abb. 3.3., Foto 4c., weiße Pfeile). Abgesehen davon weisen die inokulierten AUX1-k.o.-Pflanzen im Vergleich zur nicht-inokulierten Kontrolle ein wesentlich besseres Wachstum auf (Abb. 3.3, Fotos 4a. bis d.). Hier zeigen sich jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den als Inokulum verwendeten Bakterien. Die Inokulation bewirkt eine Verlängerung der Haupt- und Seitenwurzeln sowie der Wurzelhaare. Außerdem erhöht sich die Anzahl der Seitenwurzeln und der Wurzelhaare.

3.3.5 Wurzelhaarbesatz von *Arabidopsis thaliana* nach Inkubation mit *Azospirillum brasilense spec.*

Zur genaueren Charakterisierung des Wurzelhaarwachstums bei *Arabidopsis thaliana* in Gegenwart von *Azospirillum brasilense* wurden die Pflanzen aus Abschnitt 3.3.1 (*Arabidopsis*-Wildtyp) und 3.3.4 (AUX1-k.o.-Mutante) unter dem Binokular vergrößert betrachtet. Abbildung 3.4 zeigt den typischen Wurzelhaarbesatz einer *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanze. Hier wird deutlich, daß die nicht-inokulierten Kontrollpflanzen (Abb. 3.4, Foto a.) nur ein sehr schwaches Wurzelhaarwachstum aufweisen. Bei einer geringen Wurzelhaardichte zeigen die vorhandenen Wurzelhaare eine maximale Länge von etwa 0,5 mm. Eine deutliche Veränderung des Wurzelhaarbesatzes zeigt sich bei den inokulierten Wildtyp-Pflanzen. *Azospirillum brasilense* Sp7 (Abb. 3.4, Foto b.) bewirkt sowohl eine Verdichtung als auch eine Verlängerung der Wurzelhaare insbesondere im Bereich der Wurzelspitze („Wurzelhaarbüschel“). Die Wurzelhaare sind hier etwa 1 bis 1,5 mm lang. Noch stärker zeigt sich dieser Effekt in Gegenwart des Auxin-hyperproduzierenden Stammes FT326 (Abb. 3.4, Foto d.). Die Wurzelhaarbüschel sind noch dichter, und die Wurzelhaare zeigen z.T. eine Länge bis zu 2 mm. Der Stamm SpM7918 (Abb. 3.4, Foto c.) bewirkt zwar ebenfalls eine Verlängerung und Verdichtung des Wurzelhaarbesatzes, allerdings weisen die inokulierten Pflanzen keine büschelartigen Wurzelspitzen auf. Der Wurzelhaarbesatz ist eher gleichmäßig stark über die gesamte Wurzel verteilt. Die Länge der Wurzelhaare geht nicht über 1 mm hinaus. Vergleicht man den Wurzelhaarbesatz des nicht-inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyps (Abb. 3.4, Foto a.) mit dem der AUX1-k.o.-Pflanzen (Abb. 3.5, Foto a.), ist auch bei der Mutante erkennbar, daß das Wurzelhaarwachstum sehr schwach ausgeprägt ist. Die mit *Azospirillum brasilense* Sp7 und FT326 (Abb. 3.5, Foto b. und d.) inokulierten AUX1-k.o.-Pflanzen zeigen im Gegensatz zum inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp nicht die starke Verdichtung und Verlängerung des Wurzelhaarbesatzes (keine „Wurzelhaarbüschel“). Die Wurzelhaare sind eher gleichmäßig über die gesamte Wurzel verteilt. Der Einfluß des SpM7918-Stammes (Abb. 3.5, Foto c.) auf den Wurzelhaarbesatz ist mit dem auf den *Arabidopsis thaliana* Wildtyp vergleichbar (Abb. 3.4, Foto c.).

**Abb. 3.4**

Unterschiedlicher Wurzelhaarbesatz von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp), nicht inokuliert (a.) und nach 14-tägiger Inkubation mit (b.) *Azospirillum brasilense* Sp7, (c.) *A. brasilense* SpM7918 und (d.) *A. brasilense* FT326. Der Balken entspricht 2 mm.

**Abb. 3.5**

Wurzelhaarbesatz von *Arabidopsis thaliana* AUX1-k.o., nicht inokuliert (a.) und nach 14-tägiger Inkubation mit (b.) *Azospirillum brasilense* Sp7, (c.) *A. brasilense* SpM7918 und (d.) *A. brasilense* FT326. Der Balken entspricht 5 mm.

3.3.6 Trockengewichte von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp) nach Inokulation

Neben der Morphologie wurde auch die Veränderung des Trockengewichts von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp) nach Inokulation mit den in Kapitel 3.3 beschriebenen *Azospirillum*-Stämmen untersucht. Die Pflanzen wurden hierzu, wie in Kapitel 2.4.1.3 beschrieben, angezogen und inokuliert. Die Veränderungen im Trockengewicht wurden aus drei Versuchsreihen mit jeweils 25 Pflanzen statistisch ermittelt und sind in Abbildung 3.6 graphisch wiedergegeben. Die Messungen ergaben, daß sich das Gesamt-trockengewicht von *Arabidopsis thaliana* (Abb. 3.6 a.) nach Inkubation mit den drei *Azospirillum*-Stämmen mindestens um den Faktor 5,5 erhöht. Am effektivsten erwies sich in dieser Hinsicht Stamm SpM7918, in dessen Gegenwart die Trockenmasse um den Faktor 8 anstieg. Während die Kolonisierung mit dem Wildtyp von *Azospirillum brasilense* das Trockengewicht der Pflanze um den Faktor 6,5 erhöhte, hatte der Auxin-Hyperproduzent FT326 mit 5,5 den niedrigsten Faktor. Betrachtet man Sproß- und Wurzelsystem getrennt voneinander (Abb. 3.5 b. und c.), fällt auf, daß diese Tendenz zwar für beide Organe gilt, für die gefundenen Unterschiede im Gesamt-trockengewicht jedoch vor allem das Wurzelsystem verantwortlich ist.

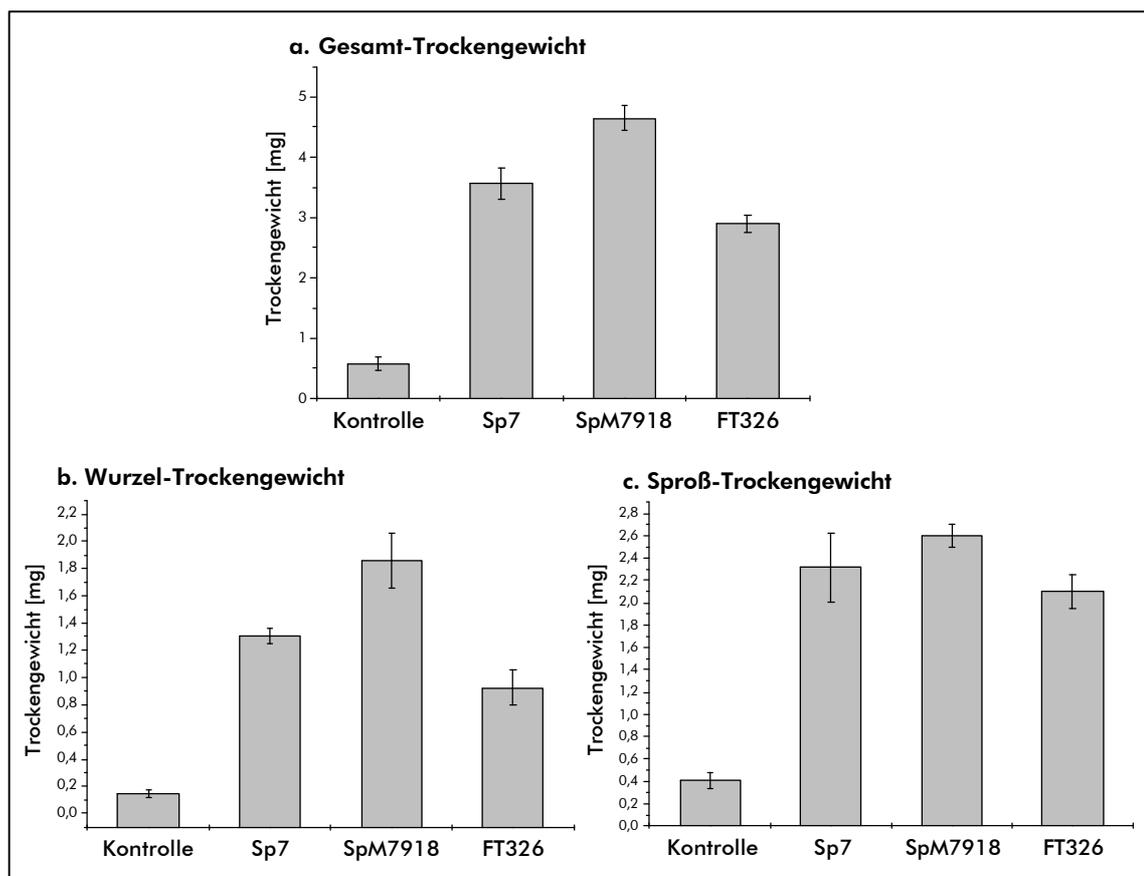


Abb. 3.6

Mittlere Trockengewichte von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp) nach 14-tägiger Inkubation mit den *Azospirillum-brasilense*-Stämmen Sp7, SpM7918 und FT326. Betrachtet werden jeweils das Gesamt- (a.) sowie das Wurzel- (b.) und Sproß-Trockengewicht (c.). Gezeigt sind die Mittelwerte (n=3) und der Standardfehler.

Die Steigerung des Trockengewichts gegenüber der Kontrolle ist hier durch den SpM7918-Stamm mit dem Faktor 12,8 doppelt so hoch wie beim FT326-Stamm (6,4). Der *Azospirillum*-Wildtyp steigert das Wurzelgewicht um das 9,3-fache. Die Zunahme des Trockengewichts im Sproßbereich ist mit Steigerungen um das 5,6- (Sp7-Stamm), 6,3- (SpM7918) und 5,1-fache (FT326) bei allen drei Stämmen ähnlich stark.

3.3.7 Ko-Inokulation des *Arabidopsis*-Wildtyps mit *A. brasilense* spec. und dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob sich die wachstumsfördernden Effekte von Azospirillen auf *Arabidopsis thaliana* auch in Gegenwart eines phytopathogenen Bakteriums ausprägen. Dafür wurden *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen, wie in Kapitel 2.4.1.2 beschrieben, angezogen und anschließend gleichzeitig mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* und jeweils einem der drei in Kapitel 3.3 beschriebenen *Azospirillum*-Stämme inokuliert. Während die optische Dichte (OD_{578}) von *Azospirillum brasilense* zum Inokulationszeitpunkt immer bei 1 lag, wurde *Ralstonia solanacearum* mit einer OD_{578} von 0,5 oder 1 als Inokulum eingesetzt. Die Kontrollpflanzen wurden nur mit dem Phytopathogen beimpft.

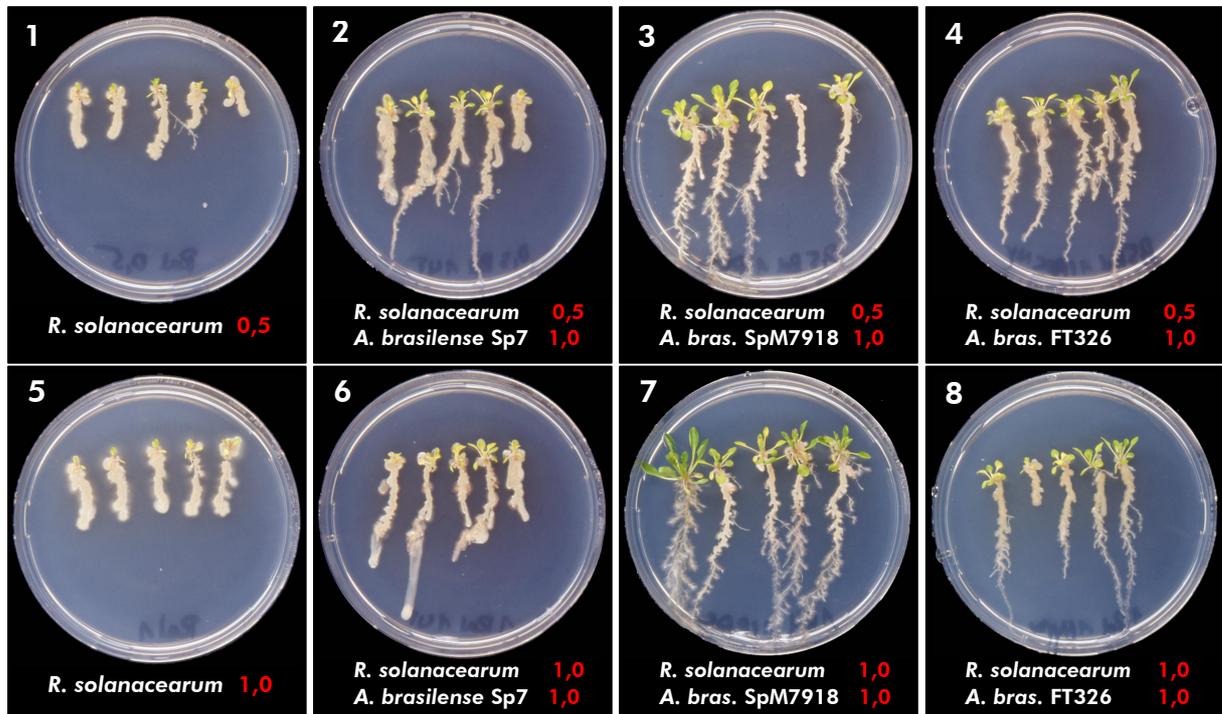


Abb. 3.7

Morphologie von *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen nach 14-tägiger Inkubation mit *R. solanacearum* (Foto 1 und 5) sowie nach Ko-Inokulation mit *A. brasilense* Sp7 (Foto 2 und 6), SpM7918 (Foto 3 und 7) und FT326 (Foto 4 und 8). Die roten Zahlen geben die unterschiedlichen optischen Dichten bei 578 nm zum Zeitpunkt der Inokulation an. Der Durchmesser der Agarplatten beträgt 8,5 cm.

Die nur mit dem Phytopathogen inokulierten Kontrollen (Abb. 3.7, Foto 1 und 5) belegen, daß *Ralstonia solanacearum*, unabhängig von der gewählten optischen Dichte, das Wurzel- und Sproßwachstum von *Arabidopsis thaliana* stark behindert. Die Wurzeln sind von den Bakterien komplett überwachsen, und es sind kaum Seitenwurzeln zu erkennen. Es zeigt sich dagegen auf den Abbildungen der Ko-Inokulation (Abb. 3.7, Foto 2 bis 4 und 6 bis 8), daß in Gegenwart der Azospirillen die pathogene Wirkung von *Ralstonia* z. T. gemindert wird. Am deutlichsten wird dieses Resultat beim SpM7918-Stamm (Abb. 3.7, Foto 3 und 7), der offensichtlich das Pathogen fast verdrängt hat. Die Pflanzen zeigen hier ein vergleichsweise üppiges Wurzel- und Sproßwachstum. Im Gegensatz dazu können *Azospirillum*-Wildtyp (Abb. 3.7, Foto 2 und 6) und der Auxin-Hyperproduzent FT326 (Abb. 3.7, Foto 4 und 8) die pathogene Wirkung von *Ralstonia* nur mäßig beeinflussen, wobei Stamm FT326 noch erfolgreicher ist als der Wildtyp. Die bei der Inokulation gewählten unterschiedlichen optischen Dichten auf Seiten der Azospirillen bewirken kaum Unterschiede im Pflanzenwachstum und haben keinen deutlichen Einfluß auf das pathogene Bakterium.

3.4 Morphologieversuche mit potentiellen bakteriellen Ausscheidungsprodukten

Da die Inokulationsversuche in Kapitel 3.3 gezeigt haben, daß Azospirillen einen erheblichen Einfluß auf die *Arabidopsis-thaliana*-Morphologie haben, stellt sich nun die Frage, welche bakteriellen Stoffe bei diesen Veränderungen eine Rolle spielen. Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, welche bakteriell produzierten Moleküle einen Einfluß auf die Pflanzenmorphologie haben und ob die Effekte durch Zugabe synthetischer Stoffe imitiert werden können. Dabei wurde berücksichtigt, daß Azospirillen neben der Fähigkeit Phytoeffektoren zu produzieren und auszuschleusen, ebenfalls in der Lage sind, molekularen Stickstoff aus der Luft zu Ammonium umzusetzen. Da Azospirillen auch Ammonium aktiv ausscheiden können, liegt die Vermutung nahe, daß die Pflanze davon profitieren kann. Allerdings konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, daß pflanzenwachstumsfördernde Effekte auf dieses Ammonium zurückzuführen sind. Mit Hilfe der folgenden Versuche sollte zunächst geklärt werden, ob *Azospirillum brasilense* an der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* Stickstoff fixiert, und welchen morphologischen Einfluß Ammonium auf die *Arabidopsis*-Pflanzen hat. Schließlich wurde der Einfluß der Phytoeffektoren Gibberellinsäure und Auxin auf die Pflanzen-Morphologie untersucht.

3.4.1 Nachweis der Stickstofffixierung durch wurzelassoziierte Azospirillen

Um zu ermitteln, ob *Azospirillum brasilense* bei der Kolonisierung des Wurzelsystems von *Arabidopsis thaliana* molekularen Stickstoff fixiert, wurden die Wildtyp-Pflanzen in diesem Experiment mit dem *Azospirillum*-Stamm Sp245 pFAJ21 inokuliert (2.1.2). Bei diesem *Azospirillum*-Stamm handelt es sich um eine Mutante mit einer plasmidcodierten *nifH-gusA*-Fusion. Eine β -Glucuronidase-Aktivität und die damit verbundene Blaufärbung zeigt sich bei diesem Stamm, wenn das für die Nitrogenase (Enzym der Stickstofffixierung) essentielle Strukturgen *nifH* exprimiert wird. Da die Expression von *nifH* direkt mit der Stickstofffixierungsrate korreliert, ist eine auftretende Blaufärbung Nachweis dafür, daß die Azospirillen nicht nur das Enzym synthetisieren, sondern auch tatsächlich Stickstoff fixieren. Die Pflanzenanzucht und Inkubationsdauer mit den Bakterien (2.4.1.2) wurde den Morphologie-Versuchen in Kapitel 3.3 angepaßt. Die Ernte der Pflanzen erfolgte nach 14-tägiger Inkubation, zum gleichen Zeitpunkt wie die Auswertung der Morphologie-Versuche. Die geernteten Pflanzen wurden über Nacht in GUS-Färbelösung inkubiert (2.3) und anschließend fotografiert. Foto a. in Abbildung 3.8 zeigt das Wurzelsystem der inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen. Die für eine β -Glucuronidase-Aktivität charakteristische Blaufärbung tritt meist an den Seitenwurzeln (weiße Pfeile) und hier besonders an den Wurzelspitzen (Abb. 3.8, Foto b.) auf.

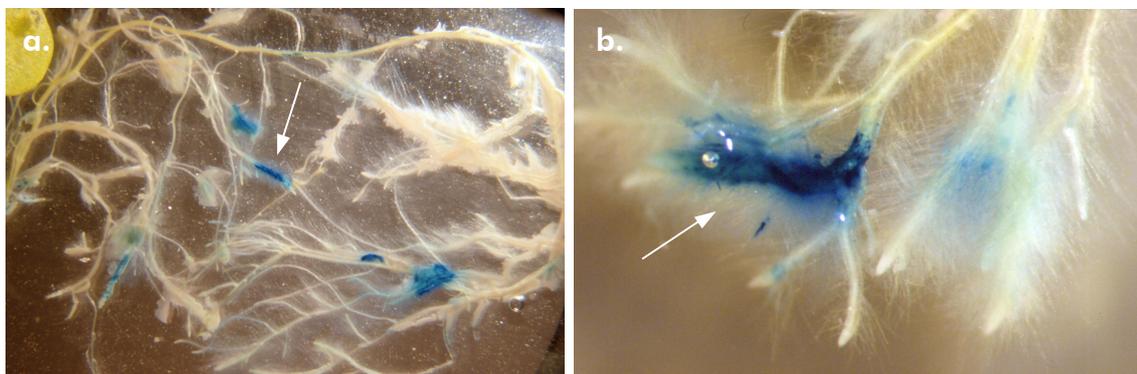


Abb. 3.8

Expression des *nifH*-Gens durch wurzelassoziierte Azospirillen. Foto (a.) zeigt einen Überblick des Wurzelsystems von drei *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen (6-fache Vergrößerung). Deutlich erkennbar sind die Blaufärbungen an einigen Wurzelspitzen (weißer Pfeil). Auf Foto (b.) sind Wurzelspitzen mit starken Blaufärbungen am Wurzelhaarbesatz vergrößert (16-fach) dargestellt.

3.4.2 Morphologie von *Arabidopsis thaliana* in Gegenwart von Ammonium (NH_4^+)

Nachdem der vorangegangene Versuch gezeigt hatte, daß Azospirillen an der Pflanzenwurzel Stickstoff fixieren, sollte dieser Ansatz Aufschluß darüber geben, ob Ammonium als potentielltes Ausscheidungsprodukt der Azospirillen einen Einfluß auf die Morphologie hat. Die Inkubation der *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen erfolgte auf $\text{MS}^{1/2}$ -Grundmedium (2.2) mit einem Zusatz von 10 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl). Als Kontrolle wurden die Pflanzen noch zusätzlich mit den verschiedenen Azospirillen-Stämmen (3.3) inokuliert und 14 Tage inkubiert. Die Morphologie der in Gegenwart von Ammonium gewachsenen Pflanzen (Abb. 3.9, Foto a.) unterscheidet sich von der nur auf $\text{MS}^{1/2}$ -Grundmedium gewachsenen Pflanzen (vgl. Abb. 3.3, Foto 1a.). Die Hauptwurzel der mit Ammonium behandelten Pflanzen ist gestauchter und es sind kaum Seitenwurzeln vorhanden. Des weiteren kann in Gegenwart von NH_4Cl nach einer Inokulation (Abb. 3.9, Foto b. bis d.) keine extreme Veränderung der Morphologie festgestellt werden. Die inokulierten Pflanzen haben zwar mehr und längere Seitenwurzeln als die nicht-inokulierte Kontrolle, im Vergleich zu den nicht mit Ammonium behandelten Pflanzen aus Kapitel 3.3.1 (Abb. 3.3, Fotos 1b. bis d.) ist das Wachstum aber nur schwach verbessert. Zudem sind Wurzelhaare kaum zu beobachten. Auch auf das Sproßwachstum hatte das Ammoniumangebot sowie die Kolonisierung keinen deutlichen Einfluß. Bemerkenswert ist, daß die Azospirillen selbst nur sehr schlecht gewachsen sind, obwohl die Bakterien Ammonium als Stickstoffquelle bevorzugten.

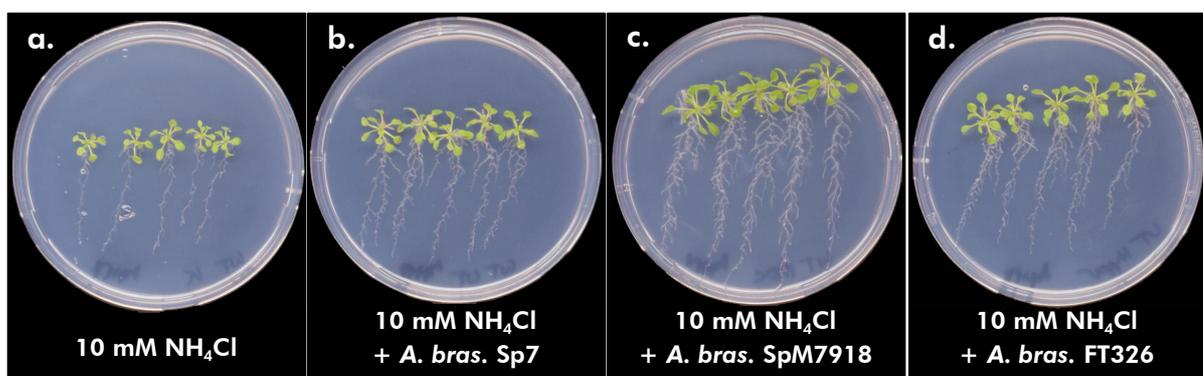


Abb. 3.9

Morphologie von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp) auf NH_4Cl -haltigem Medium (10 mM) nach 14-tägigem Wachstum mit *Azospirillum brasilense*. Als Inokulum dienten die Stämme Sp7 (b.) SpM7918 (c.) und FT326 (d.). Die Pflanzen auf Foto (a.) sind nicht inokuliert. Der Durchmesser der Agarplatten beträgt 8,5 cm.

3.4.3 Einfluß von Gibberellinsäure (GA_3) auf die Morphologie

Da auch GA_3 zu den potentiellen Ausscheidungsprodukten von *Azospirillum brasilense* gehört, wurde in diesem Experiment der Einfluß verschiedener Konzentrationen dieses Phytoeffektors auf die Morphologie von *Arabidopsis thaliana*

untersucht. Zu diesem Zweck wurden *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen für 14 Tage auf GA₃-haltigem Medium in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM, 1 μM, 5 μM und 10 μM inkubiert (2.4.1.2). Abbildung 3.10 zeigt, daß im Gegensatz zur nicht-behandelten Kontrolle (0 μM GA₃), die Pflanzen in Gegenwart von GA₃ etwas längere Wurzeln aufweisen. Allerdings nimmt der Umfang der Wurzeln nach einer GA₃-Behandlung nicht zu. Auch die Anzahl an Seitenwurzeln und der Wurzelhaarbesatz war bei diesen Pflanzen unverändert. Zudem sind die wurzelmorphologischen Effekte unabhängig von der gewählten GA₃-Konzentration. Ein deutlicherer Einfluß zeigte sich dagegen auf das Wachstum des Sprosses. Dieser erwies sich als größer und kräftiger in Gegenwart von GA₃, wobei sich ein maximaler Effekt bei 500 nM GA₃ einstellte.

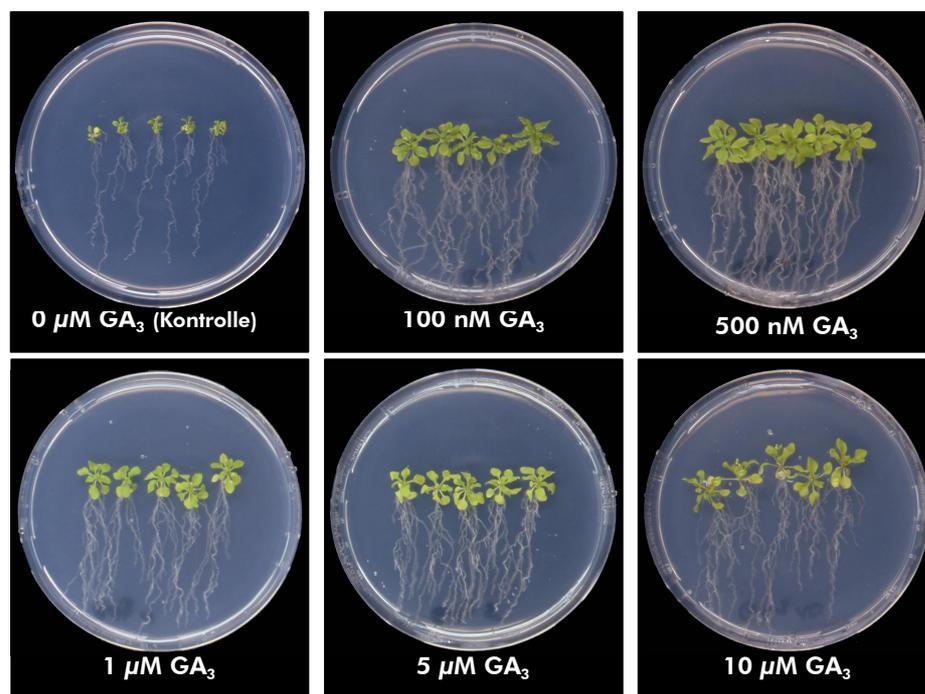


Abb. 3.10

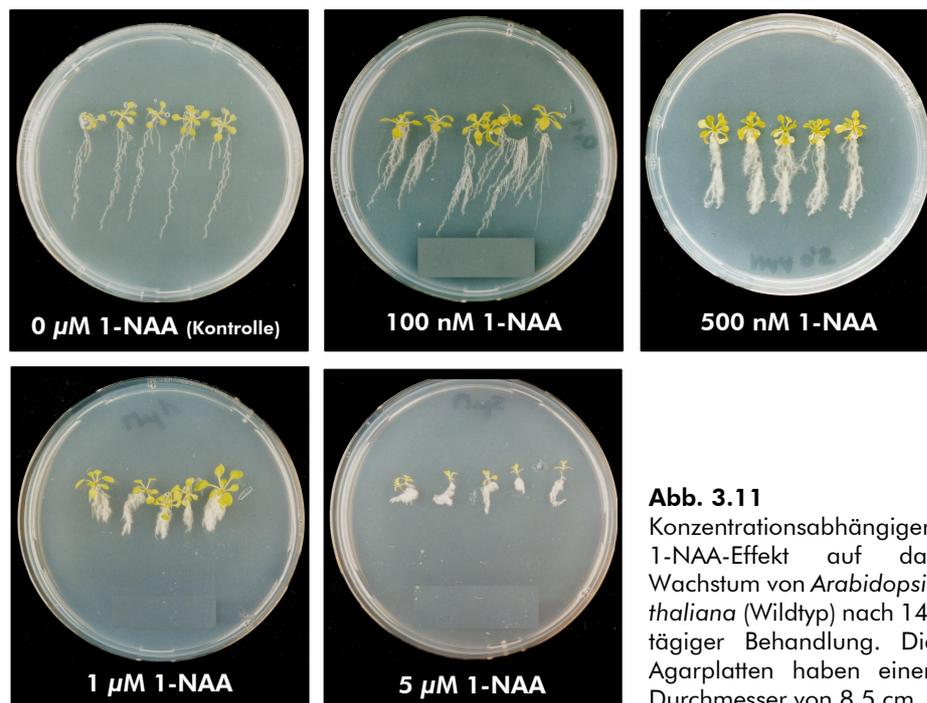
Arabidopsis thaliana (Wildtyp) nach 14-tägiger Behandlung mit GA₃ in verschiedenen Konzentrationen. Der Durchmesser der Agarplatten beträgt 8,5 cm.

3.4.4 Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit 1-Naphtylelessigsäure (1-NAA)

Die Experimente in den beiden folgenden Abschnitten sollten zeigen, ob und inwieweit sich die durch Azospirillen verursachten morphologischen Effekte bei *Arabidopsis thaliana* durch die externe Verabreichung von Auxin imitieren lassen. Da Indol-3-Essigsäure (IAA) sehr schnell photooxidiert und damit inaktiv wird, wurde aufgrund der wesentlich höheren Stabilität das wirkungsgleiche Auxin-Analog 1-NAA in den Experimenten eingesetzt (Patten und Glick, 1996; Müller, 1997).

3.4.4.1 Morphologie von *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit 1-NAA

Die Pflanzenanzucht bei diesem Versuch erfolgte auf MS^{1/2}-Agarplatten ohne (Kontrolle) bzw. mit dem synthetischen Phytoeffektor 1-NAA in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM, 1 μ M und 5 μ M (2.4.1.2). Die Auswertung der Morphologie erfolgte nach einer Inkubation von 14 Tagen und ergab das in Abbildung 3.11 und 3.12 dargelegte Ergebnis. Die Pflanzen, die mit der niedrigsten 1-NAA-Konzentration (100 nM 1-NAA) behandelt wurden, waren den unbehandelten Kontrollpflanzen (0 μ M 1-NAA) morphologisch am ähnlichsten. Mit steigender 1-NAA-Konzentration zeigte sich dann eine zunehmende Stauchung von Haupt- und Seitenwurzeln, wobei sich jedoch gleichzeitig die Anzahl der Seitenwurzeln erhöhte (Abb. 3.11). Ab einer Konzentration von 500 nM konnte sowohl eine deutliche Verdichtung als auch eine Verlängerung der Wurzelhaare beobachtet werden (Abb. 3.12, Foto b. und c.). Bei den höheren 1-NAA-Konzentrationen von 1 μ M und 5 μ M wurde ein stark gestauchtes Wurzelwerk beobachtet. Diese Konzentrationen wirkten demnach bereits hemmend auf das Wurzelwachstum. Dieser Effekt trat am stärksten bei Pflanzen auf, die mit 5 μ M 1-NAA behandelt wurden. Sie zeigten zudem einen deutlich verkleinerten Sproßhabitus. Dagegen war das Sproßwachstum im Konzentrationsbereich von 100 nM bis 1 μ M 1-NAA unbeeinflusst.



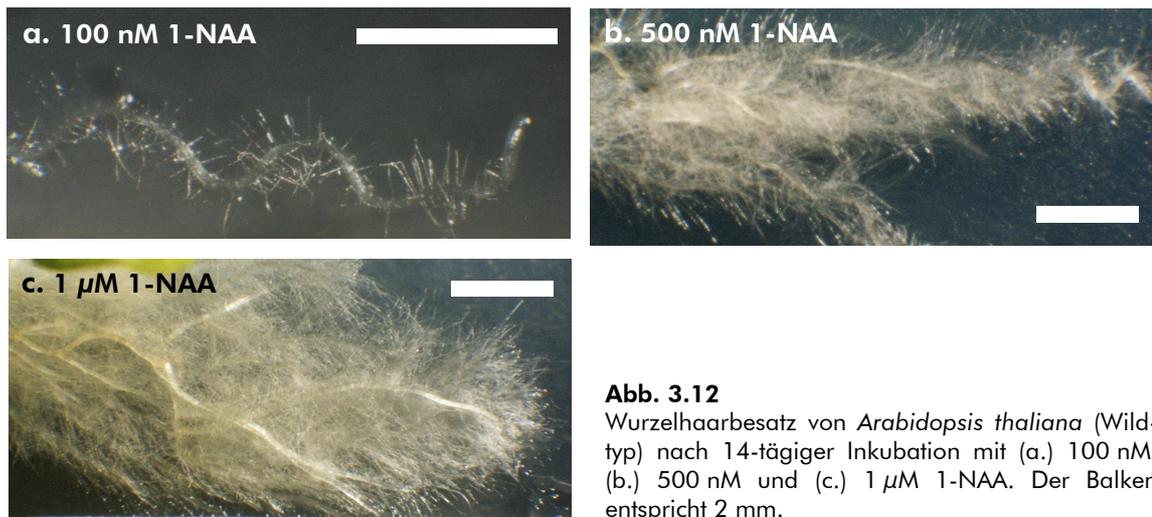
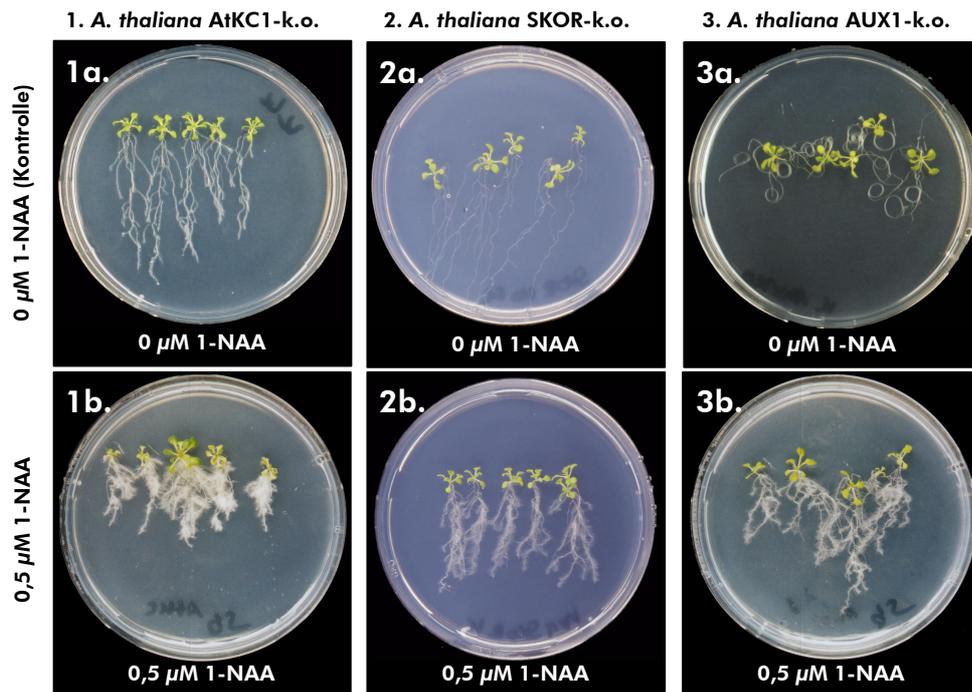


Abb. 3.12
Wurzelhaarbesatz von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp) nach 14-tägiger Inkubation mit (a.) 100 nM, (b.) 500 nM und (c.) 1 μM 1-NAA. Der Balken entspricht 2 mm.

3.4.4.2 Morphologie von *Arabidopsis thaliana* AtKC1-k.o.-, SKOR-k.o.- und AUX1-k.o.-Pflanzen nach Behandlung mit 1-NAA

Die Ergebnisse der Ammonium- (3.4.2), Gibberellinsäure- (3.4.3) und 1-NAA-Versuche (3.4.4.1) zeigten, daß Auxin den deutlichsten Einfluß auf die Wurzelmorphologie hatte. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Auxin auf die *Arabidopsis*-Mutanten AtKC1-k.o., SKOR-k.o. und AUX1-k.o. näher untersucht. Die Pflanzen wurden dafür auf Agarplatten mit 0,5 μM 1-NAA inkubiert (2.4.1.2). Diese Konzentration wurde infolge der Beobachtungen des vorangegangenen Experiments (3.4.4.1) gewählt, da sich einerseits bereits der Auxin-Effekt im Vergleich zur Kontrolle deutlich zeigte, andererseits aber noch keine übermäßige Hemmung des Wachstums eintrat. Nach 14-tägiger Inkubation zeigten die 1-NAA-behandelten AtKC1-k.o.-Pflanzen (Abb. 3.13, Foto 1b.) im Gegensatz zur Kontrollpflanze (Abb. 3.13, Foto 1a.) ein gestauchteres Wurzelwachstum und eine deutliche Verdichtung des Wurzelhaarbesatzes. Bei den SKOR-k.o.-Pflanzen (Abb. 3.13, Foto 2b.) ergab sich durch den Einsatz von 1-NAA eine Erhöhung der Seitenwurzelanzahl sowie ebenfalls eine Verlängerung und Verdichtung der Wurzelhaare. Wie bei den 1-NAA-behandelten AtKC1-k.o.-Pflanzen zeigte sich auch bei der SKOR-k.o.-Mutante eine Stauchung des Wurzelwerks. Der durch 1-NAA verursachte Phänotyp der SKOR-k.o.-Pflanzen ist vergleichbar mit dem des behandelten *Arabidopsis*-Wildtyps (0,5 μM 1-NAA) in Abbildung 3.11. Bei der behandelten AUX1-k.o.-Mutante (Abb. 3.13, Foto 3b.) zeigte sich ebenfalls eine Verdichtung des Wurzelhaarbesatzes. Hier fällt aber auf, daß die für die AUX1-Kontrollpflanzen (Abb. 3.13, Foto 3a.) typischen Wurzelkringel und -schlaufen fehlten. Die Behandlung mit 1-NAA bewirkte somit die Wiederherstellung gravitropen Wachstums. Keinen Einfluß dagegen hatte 1-NAA auf den Sproßhabitus der drei verwendeten *Arabidopsis*-Mutanten.

**Abb. 3.13**

Arabidopsis-thaliana-Mutanten AtKC1-k.o. (1a./1b.), SKOR-k.o. (2a./2b.) und AUX1-k.o. (3a./3b.) nach 14-tägiger Inkubation mit 0,5 μM 1-NAA (b.-Reihe). Die a.-Reihe zeigt die nicht mit 1-NAA behandelten Verlust-Mutanten. Der Durchmesser der Agarplatten beträgt 8,5 cm.

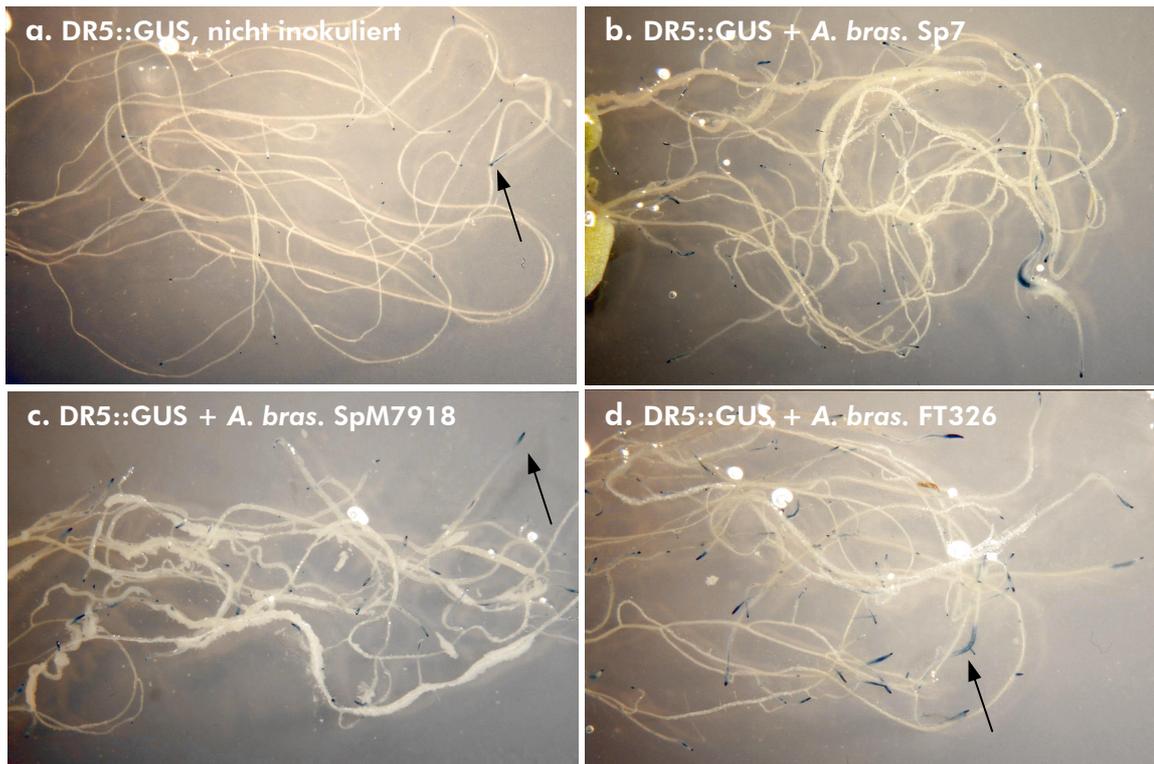
3.5 Auxingehalt und -transporter in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana*

Die vorangegangenen Versuche des Kapitels 3.4 belegen, daß der Phytoeffektor IAA bzw. 1-NAA an der Ausprägung der Wurzelmorphologie maßgeblich beteiligt ist. In Kapitel 3.3 zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Wurzelmorphologie durch die Inokulation mit *Azospirillen*, die verschiedene Mengen an Auxin ausscheiden. Aufgrund dieser Beobachtungen richtete sich das weitere Interesse auf einen möglichen Einfluß der drei *Azospirillum*-Stämme auf den Auxingehalt in der Wurzel und auf die Expression des Auxin-Influx-Carriers AUX1.

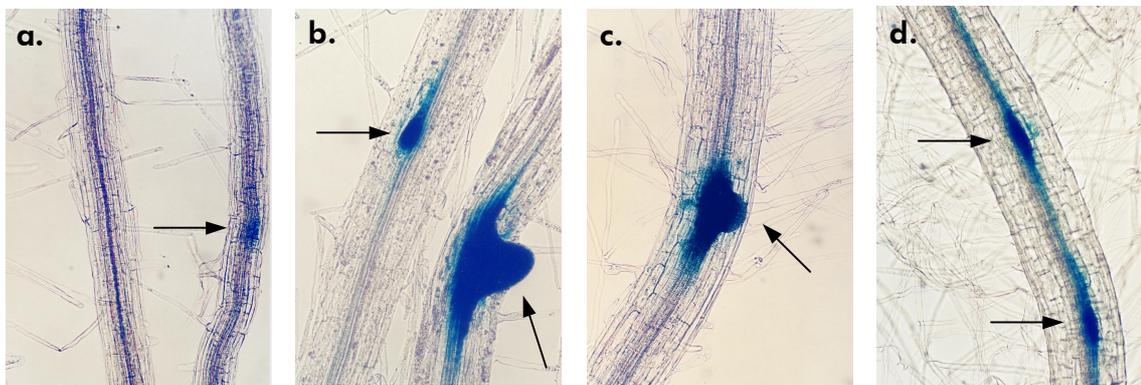
3.5.1 Veränderung des IAA-Gehalts in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Inkubation mit *Azospirillum brasilense spec.*

Um zu untersuchen, inwieweit sich der Gehalt des Phytoeffektors IAA im Wurzelsystem von *Arabidopsis thaliana* im Zuge einer Inokulation mit *Azospirillum brasilense* verändert, wurde die Auxin-sensitive *Arabidopsis thaliana*-DR5::GUS-Mutante (2.1.1), wie unter 2.4.1.2 beschrieben, angezogen und mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7 (Wildtyp), SpM7918 (Hypoproduzierer) und FT326 (Hyperproduzierer) inokuliert. Das GUS-Reporter-Gen ist bei den verwendeten *Arabidopsis*-Pflanzen mit *auxine responsive elements* (AuxRE) fusioniert. Diese AuxRE reagieren sehr sensitiv auf das Vorhandensein von IAA bzw. 1-NAA. Eine Aktivierung dieser Elemente führt zur Expression der β -Glucuronidase, die sich nach Umsetzung des Substrates X-GlcA durch die entstandene Blaufärbung nachweisen läßt. Blaugefärbte Bereiche treten demnach dort auf, wo sich Auxin befindet. Ob das nachgewiesene Auxin bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs ist, läßt sich mit dieser Mutante allerdings nicht klären.

Die Abbildung 3.14 zeigt die gefärbten Wurzeln von drei DR5::GUS-Pflanzen. Die nicht-inokulierte Kontrolle (Abb. 3.14, Foto a.) belegt, daß Auxine bei *Arabidopsis thaliana* vor allem in den Wurzelspitzen und z. T. auch an der Basis austretender Seitenwurzeln auftreten. Bei den mit *Azospirillen* inokulierten Pflanzen (Abb. 3.14, Fotos b. bis d.) treten die Blaufärbungen zwar an den gleichen Stellen auf, jedoch wesentlich häufiger und intensiver. Am deutlichsten zeigt sich dies bei Stamm FT326, der die meisten Blaufärbungen bei *Arabidopsis thaliana* verursacht (Abb. 3.14, Foto d.). Diese erstrecken sich sogar teilweise über einen längeren Wurzelbereich und sind auch in Bereichen von Seitenwurzelprimordien (vgl. Abb. 1.1) zu finden. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.15 zeigen den Auxingehalt in Seitenwurzeln bzw. Seitenwurzelprimordien ohne (Abb. 3.15, Foto a.) und nach Inokulation mit den drei *Azospirillum*-Stämmen (Abb. 3.15, Foto b. bis d.). Die stärkere Blaufärbung bei den inokulierten Pflanzen deutet auf eine Akkumulierung des Auxins an den beschriebenen Stellen (schwarze Pfeile) hin.

**Abb. 3.14**

Nachweis von Auxin in der Wurzel von *A. thaliana* DR5::GUS über das GUS-Reportersystem nach Inkubation mit (b.) *A. brasilense* Sp7, (c.) *A. brasilense* SpM7918 und (d.) *A. brasilense* FT326 (6-fache Vergrößerung). Foto (a.) zeigt die nicht-inokulierte Kontrolle.

**Abb. 3.15**

160-fache Vergrößerung der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* DR5::GUS nach Inkubation mit (b.) *A. brasilense* Sp7, (c.) *A. brasilense* SpM7918 und (d.) *A. brasilense* FT326. Foto (a.) zeigt die nicht-inokulierte Kontrolle.

3.5.2 Lokalisation der Expression eines Auxin-Transporters in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* nach Inokulation mit *Azospirillum brasilense* spec.

Um zu überprüfen, ob der Auxin-Aufnahmetransporter AUX1 in Gegenwart von Azospirillen exprimiert wird, wurden *Arabidopsis thaliana*-AUX1::GUS-Pflanzen (2.1.1) mit *Azospirillum brasilense* spec. inokuliert. Das GUS-Reportersystem ist bei dieser *Arabidopsis*-Mutante mit AUX1 gekoppelt, so daß eine auftretende Blaufärbung die Lokalisation des Transporters in der Wurzel ermöglicht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Bei der nicht-inokulierten Kontrolle (Abb. 3.16, Foto a.) zeigten sich Blaufärbungen nur in den Wurzelspitzen. In Gegenwart der Bakterien jedoch (Abb. 3.16, Foto b. bis d.) nahmen die Blaufärbungen, unabhängig vom Inokulum, an Intensität und Häufigkeit zu. Eine nähere Betrachtung der Wurzeln (Abb. 3.17) bei 160-facher Vergrößerung ergab, daß nach einer Inokulation der Transporter nicht nur in den Wurzelspitzen, sondern auch an der Basis der Seitenwurzeln exprimiert wurde.

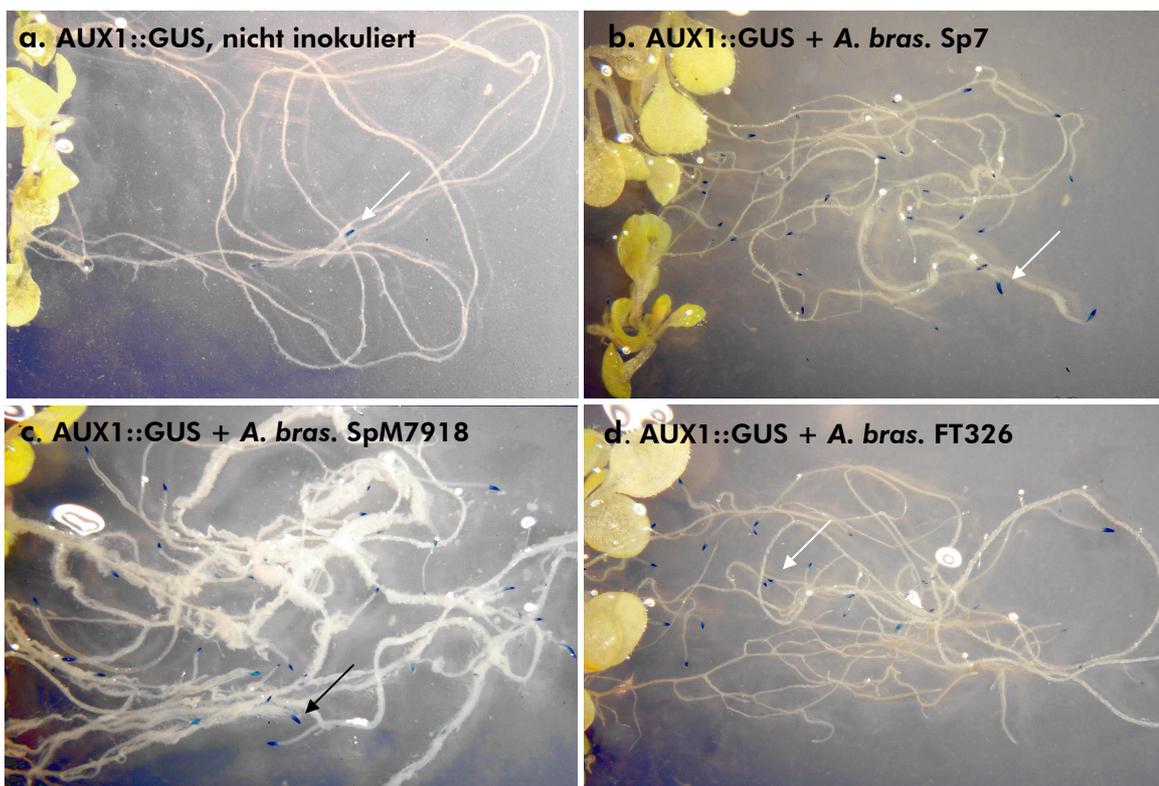
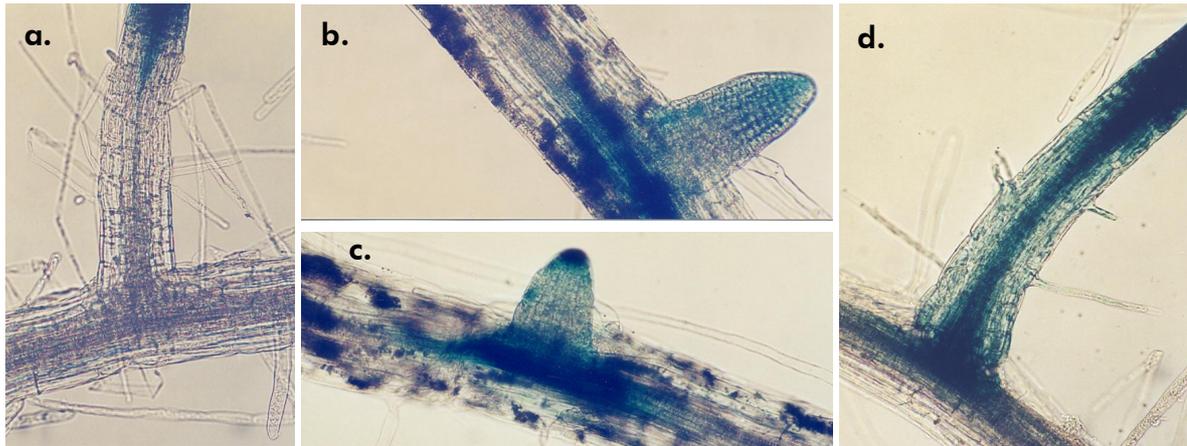


Abb. 3.16

6-fache Vergrößerung von GUS-Färbungen der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* AUX1::GUS nach Inkubation mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7 (b.), SpM7918 (c.) und FT326 (d.). Foto (a.) zeigt die nicht-inokulierte Kontrolle. Die Pfeile deuten auf blau-gefärbte Wurzelspitzen.

**Abb. 3.17**

160-fache Vergrößerung der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* AUX1::GUS, nicht inokuliert (a.) und nach Inkubation mit (b.) *A. brasilense* Sp7, (c.) *A. brasilense* SpM7918 und (d.) *A. brasilense* FT326.

3.6 Expressionsanalysen

In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob die Kolonisierung des *Arabidopsis-thaliana*-Wurzelsystems durch Azospirillen einen Einfluß auf die Expression verschiedener K^+ -Kanaltypen in der Pflanzenwurzel hat. Die Versuche sollten klären, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen bakteriell induzierter Wurzelproliferation und der charakteristischen Aufnahme von K^+ -Ionen im Zuge pflanzlichen Wachstums besteht. Für die Expressionsanalysen, die sich auf die Wurzel konzentrierten, standen verschiedene Nachweissysteme zur Verfügung. Mit Hilfe des GUS-Reporter-Systems sollte der Wurzelaufnahmekanal AtKC1 *in situ* lokalisiert, sowie die Expressionsstärke analysiert werden. Parallel dazu wurden vor allem *atkc1*, aber auch *akt1* und *skor*, im Rahmen von Northern-Blot-Analysen als Sonde eingesetzt. Da Northern-Blot-Analysen i. d. R. nur den Nachweis stärker exprimierter Gene erlauben, wurde ein Großteil der Expressionsstudien mit Hilfe des LightCycler-Systems durchgeführt. Diese sehr sensitive Methode ermöglicht es, auch schwächer exprimierte Gene durch *real-time*-PCR quantitativ nachzuweisen. Die Analysen am LightCycler wurden für die in der Wurzel lokalisierten K^+ -Aufnahmekanäle AtKC1 und AKT1, die K^+ -Abgabekanäle SKOR und GORK sowie die „two-pore“- K^+ -Abgabekanäle KCO1 und KCO5 durchgeführt. Zusätzlich wurden die im Sproß lokalisierten Aufnahmekanäle KAT1 und AKT2/3 als Negativkontrollen eingesetzt.

3.6.1 Nachweis der *atkc1*-Expression mit Hilfe des GUS-Reportersystems

Zunächst wurden Untersuchungen des Expressionsmusters von *atkc1* mit *A. thaliana*-AtKC1p::GUS-Pflanzen (2.1.1) durchgeführt. Bei dieser Mutante ist die Expression der K⁺-Kanal-Untereinheit AtKC1 mit dem GUS-Reportergen gekoppelt. Bei den Versuchen sollte vor allem die Lokalisation von AtKC1 im Wurzelgewebe, aber auch eine Veränderung in der Expressionsstärke nach einer Inokulation analysiert werden. Dazu wurden die Pflanzen mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7, SpM7918 und FT326 inokuliert (2.4.1.2). Im Gegensatz zu den Pflanzen aus den Morphologie-Experimenten (3.3) wurden diese Pflanzen nur sieben Tage mit den Bakterien inkubiert. Grund dafür war, daß die Wurzel mit zunehmender Inkubationsdauer von den Bakterien überwachsen wurde, so daß sich die Pflanzen nicht ohne Verletzungen der Wurzelhaare von der Agaroberfläche entfernen ließen. Während die nicht-inokulierten Pflanzen (Abb. 3.18, Foto a.) unter den gegebenen Bedingungen keine Blaufärbungen und somit keine Expression von *atkc1* aufwiesen, zeigten die inokulierten Pflanzen (Abb. 3.18, Foto b. bis d.) eine sehr schwache, diffuse Blaufärbung, die sich über das gesamte Wurzelsystem erstreckte. Die Färbung ist allerdings aus technischen Gründen auf den Fotos (b. bis d.) nicht zu erkennen.

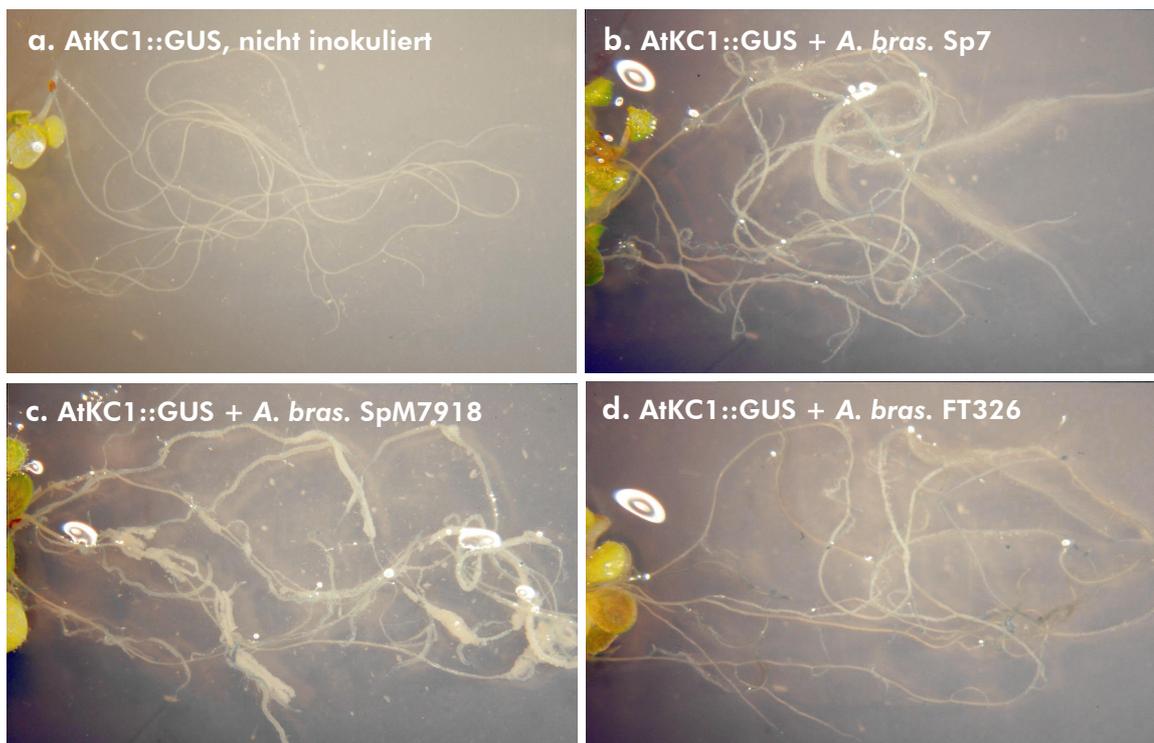


Abb. 3.18

6-fache Vergrößerung von GUS-Färbungen der Wurzel von *A. thaliana* AtKC1::GUS nach Inkubation mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7 (b.), SpM7918 (c.) und FT326 (d.). Foto (a.) zeigt die nicht-inokulierte Kontrolle.

3.6.2 Northern-Blot-Analyse der *atkc1*-Expression

Parallel zu den GUS-Untersuchungen im vorangegangenen Kapitel wurde die Expression von Kanal-Untereinheit AtKC1 im Rahmen von Northern-Blot-Analysen untersucht. Dafür wurden vier Wochen alte *Arabidopsis*-Wildtyp-Schüttelkulturen (2.4.1.5) mit dem *Azospirillum-brasilense*-Wildtyp-Stamm Sp7 inokuliert, indem die Pflanzen mit 80 ml MS^{1/2}-Grundmedium und einer Bakterien-Dichte von 10⁷ cfu/ml versetzt wurden (2.4.2.2). Die Ernte der Pflanzenwurzeln erfolgte 10, 24 und 48 Stunden (h) nach Inokulation. Der Anteil an *atkc1*-Transkripten in der Gesamt-RNA (2.4.3) der einzelnen Proben wurde, wie in den Abschnitten 2.4.4.1 bis 2.4.4.5 beschrieben, bestimmt und in drei unabhängigen Versuchsreihen repliziert. Die Ergebnisse der Northern-Blot-Analysen in Abbildung 3.19 zeigen, daß sich die Expression des *atkc1*-Gens zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (10 h, 24 h, 30 h) signifikant verändert. Das gilt für die nicht-inokulierten (Kontrolle, weiße Säulen) als auch für die mit *Azospirillum* inokulierten Pflanzen (graue Säulen). Die leichte Abnahme der *atkc1*-Expression nach 24 und 30 Stunden Inkubation mit *Azospirillum* ist nicht als Tendenz zu werten, da bei Northern-Blot-Analysen erst Veränderungen ab einem Faktor von 3 als signifikant anzusehen sind.

Northern-Blot-Analysen wurden ebenfalls mit den K⁺-Kanalgenen *akt1* und *skor* durchgeführt. Die *akt1*-Expression zeigte sich nach einer Inokulation mit *Azospirillum* nicht beeinflusst. Da es sich dabei um Ergebnisse handelte, die nicht statistisch abgesichert wurden, sind sie nicht in einer Grafik dargestellt. Eine Expression von *skor* ließ sich weder bei nicht-inokulierten noch bei inokulierten Pflanzen nachweisen. Vermutlich unterschreitet die Expressionsrate dieses Kanals die Nachweisgrenze der Analyse-Methode.

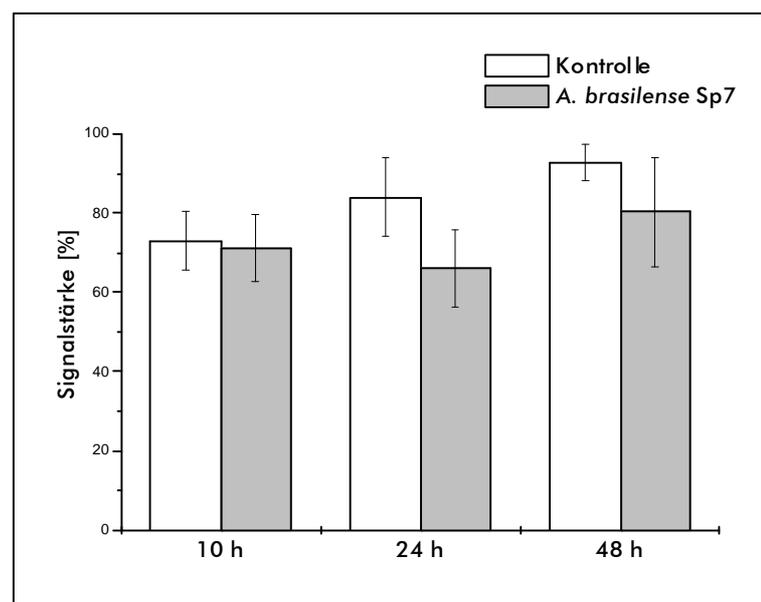


Abb. 3.19

Zeitabhängige *atkc1*-Expression im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach 10, 24 und 48 Stunden (h) Inkubation ohne (Kontrolle) und mit *Azospirillum brasilense* Sp7. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte (n=3) und die Fehlerbalken den Standardfehler.

3.6.3 Expressionsanalysen mit dem LightCycler-System

3.6.3.1 Expression verschiedener K⁺-Kanäle in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* nach Inkubation mit *Azospirillum brasilense spec.*

Für die Expressionsanalyse weiterer K⁺-Kanal-Gene, die potentiell bei einer Assoziation mit Bakterien involviert sein könnten, wurde das LightCycler-System verwendet (2.4.5). Da es sich bei den untersuchten Kanälen meist um schwach exprimierte Gene handelte, konnte die Northern-Blot-Analyse nicht eingesetzt werden. Neben den in der Wurzel lokalisierten Kanälen AtKC1, AKT1, SKOR, GORK, KCO1 und KCO5 wurde die Expression der Sproßkanäle AKT2/3 und KAT1 untersucht. Die *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen wurden, wie unter 2.4.1.4 beschrieben, angezogen und mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7, SpM7918 und FT326 inokuliert. Wie für die Northern-Blot-Analysen wurde auch hier nach der Ernte zunächst die Gesamt-RNA aus dem Wurzelgewebe isoliert (2.4.3). In einem nächsten Schritt erfolgte die Isolierung des mRNA-Anteils (2.4.5.1) und das Umschreiben der mRNA in cDNA (2.4.5.2). Mit dem LightCycler-System wurde nun der Anteil einzelner Genfragmente in dieser cDNA über eine mit Fluoreszenzmessungen kombinierte PCR quantifiziert (2.4.5.3).

Abbildung 3.20 zeigt die Expressionsergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind die Molekülmengen des jeweiligen Gens bezogen auf 10000 Moleküle des Aktin-Gens (2.4.5.6). Es wird deutlich, daß AtKC1 (> 500 Moleküle) und vor allem AKT1 (> 1500 Moleküle) in der Wurzel am stärksten exprimiert sind. Beide Kanäle zeigen jedoch keine deutliche Veränderung in der Expression nach Inokulation mit den Bakterien. Die Sproßkanäle AKT2/3 und KAT1 wurden als Negativkontrollen verwendet und wurden erwartungsgemäß in den untersuchten Wurzelproben nicht exprimiert. Die Kanäle GORK, KCO1 und KCO5 sind mit z. T. deutlich unter 500 Molekülen relativ schwach in der Wurzel exprimiert und zeigen ebenfalls keine Expressionsveränderung. Die einzige deutliche Veränderung im Expressionsverhalten ergibt sich bei dem Xylemparenchymkanal SKOR. Dieser Kanal weist bei der nicht-inokulierten Kontrolle durchschnittlich 460 Moleküle auf. Nach einer Inokulation sinkt die Anzahl der Moleküle auf etwa 60, wobei keine Unterschiede zwischen den verwendeten *Azospirillum*-Stämmen festzustellen sind.

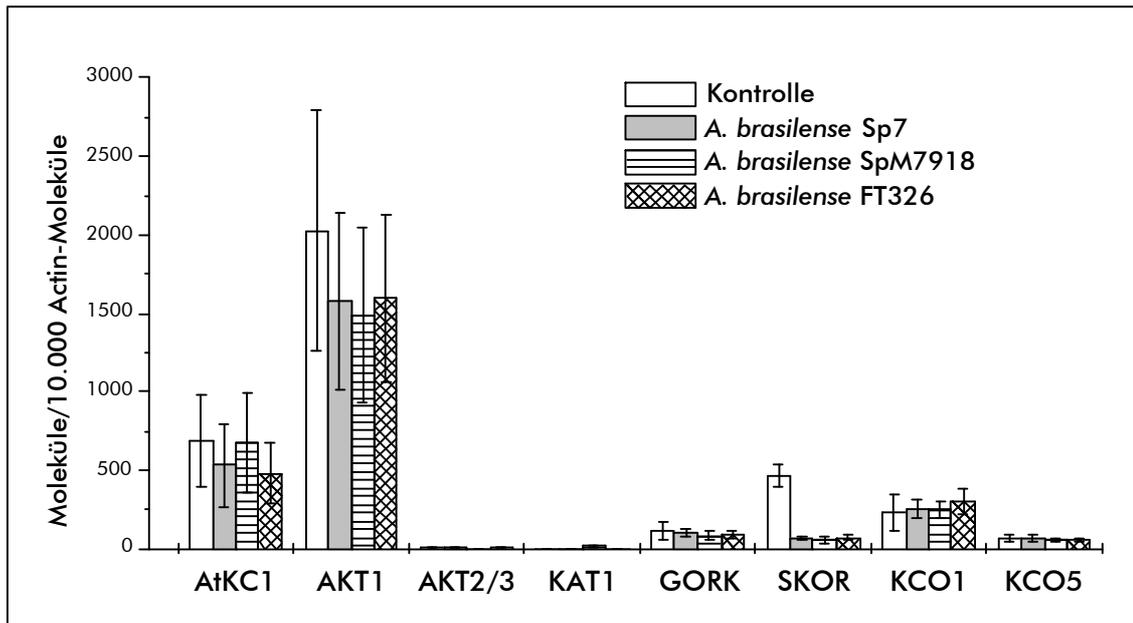
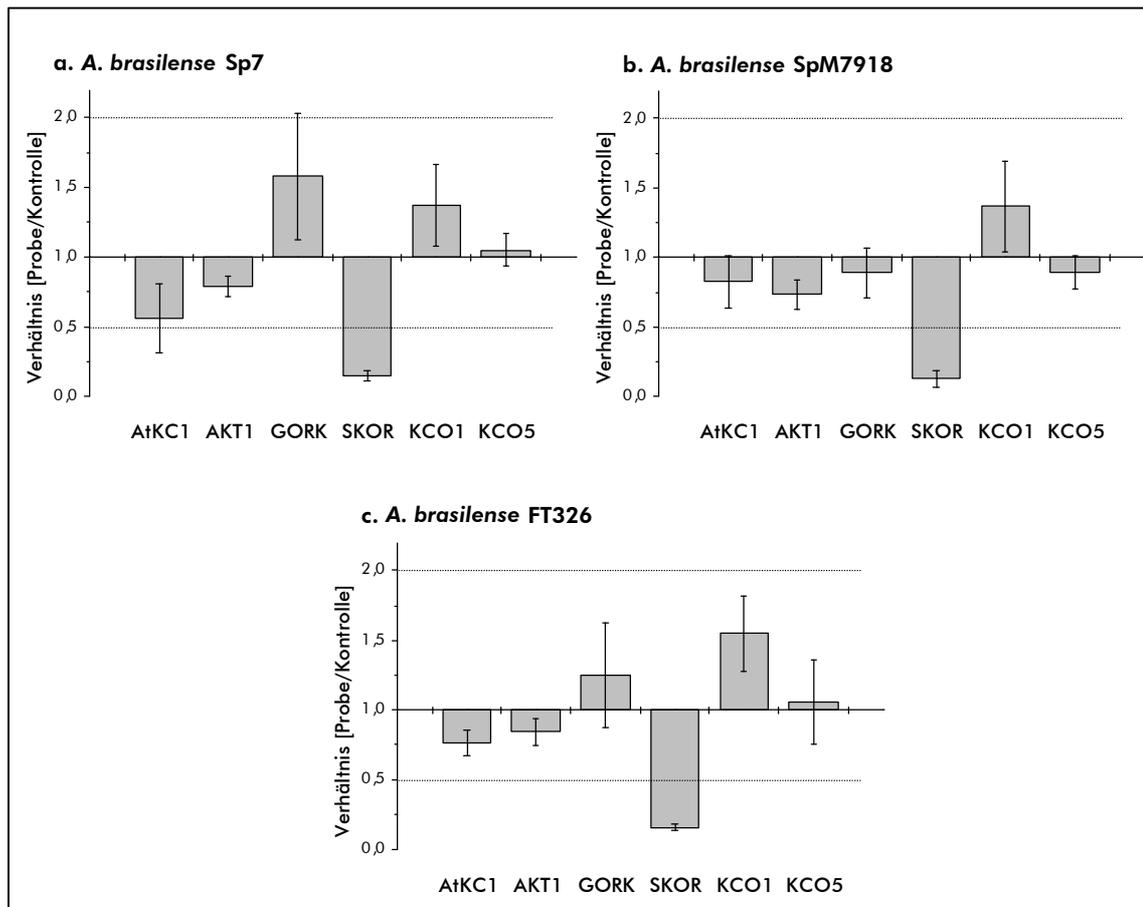


Abb. 3.20

Expression von verschiedenen K^+ -Kanälen im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* in Abwesenheit von Azospirillen als auch nach Inkubation mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7, SpM7918 und FT326. Die Grafik zeigt die Anzahl von K^+ -Kanal-RNA-Molekülen pro 10000 Molekülen Aktin2/8. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) und der Standardfehler.

Die im LightCycler-System registrierten Veränderungen der Expression gelten nur als signifikant, wenn sich die Molekülzahl einer Probe gegenüber einer Kontrolle mindestens verdoppelt (Induktion) oder halbiert (Repression) (Ache, persönliche Mitteilung). Abbildung 3.21 gibt daher die in Abbildung 3.20 aufgetragenen Molekülzahlen noch einmal als Verhältnis der Proben mit *Azospirillum brasilense* Sp7 (Grafik a.), Stamm SpM7918 (Grafik b.) und Stamm FT326 (Grafik c.) gegenüber der Kontrolle wieder. Dabei stehen die nach oben orientierten Balken für eine Zunahme und die nach unten orientierten Balken für eine Abnahme der Expression. Die Schwellenwerte für signifikante Veränderungen sind entsprechend der o. g. Regel mit den Verhältniszahlen 2,0 bzw. 0,5 (gestrichelte Linien) gegeben. Es ist deutlich zu erkennen, daß allein SKOR diese Schwelle unterschreitet, in Gegenwart der Azospirillen also signifikant reprimiert wird. Alle anderen Kanäle zeigen keine signifikante Veränderung in ihrer Expression.

**Abb. 3.21**

Darstellung der Molekülverhältnisse zwischen Kontrolle und inokulierter Probe für verschiedene in der *Arabidopsis*-Wurzel vorkommende K^+ -Kanäle. Die Grafiken zeigen die Veränderung der Expression in Gegenwart der *Azospirillum-brasilense*-Stämme Sp7 (a.), SpM7918 (b.) und FT326 (c.). Die gestrichelten Linien geben die Schwellenwerte für signifikante Veränderungen der Expression an. Die Daten zeigen die Mittelwerte ($n=3$) und den entsprechenden Standardfehler.

3.6.3.2 Expression von K^+ -Kanälen in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit 1-NAA

In Anlehnung an die Morphologieversuche mit dem Phytoeffektor 1-NAA, der in den Versuchen in Kapitel 3.4.4 den deutlichsten Effekt auf die Wurzel hatte, wurde ebenfalls der Einfluß von 1-NAA auf die Expression der im vorangegangenen Kapitel verwendeten K^+ -Kanäle untersucht. Dabei wurde zwischen einem Langzeitexperiment (vier Tage in Gegenwart von 1-NAA) und einem Kurzzeitexperiment (drei Stunden Inkubation mit 1-NAA) unterschieden. Es wurden unterschiedliche Zeitpunkte gewählt, um einen potentiell zeitabhängigen Auxin-Effekt zu erkennen. Der 4-Tage-Versuch sollte dabei eine längere Inkubation mit Azospirillen simulieren. Dafür wurden *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen, wie in Abschnitt 2.4.1.4 beschrieben, angezogen und nach 12 (4-Tage-Versuch) bzw. 16 (3-Stunden-Versuch) Tagen mit

dem als Träger dienenden Rundfilterpapier auf 1-NAA-haltiges Medium transferiert. Das Medium enthielt $0,5 \mu\text{M}$ 1-NAA, da sich diese Konzentration bei den Morphologieversuchen in Kapitel 3.4.4 als optimal herausgestellt hatte. Das Expressionsmuster der K^+ -Kanäle wurde mit dem LightCycler analysiert (2.4.5) und ist in Abbildung 3.22 wiedergegeben. Wie bei den Inokulationsversuchen in Kapitel 3.6.3.1 sind *atkc1* und *akt1* die am stärksten exprimierten K^+ -Kanäle in der Wurzel. Die Sproßkanäle AKT2/3 und KAT1 sind auch hier nicht in der Wurzel zu finden. Die Expressionsstärke von *gork*, *kco1* und *kco5* liegt unterhalb von 500 Molekülen. Diese Kanäle sind weder im Kurz- noch im Langzeitexperiment von 1-NAA beeinflusst. Eine Veränderung der Expression ist nur bei *skor* (durchgezogener Pfeil) und *atkc1* (gestrichelter Pfeil) nach 3 Stunden Inkubation mit 1-NAA (graue Säulen) zu sehen (Abb. 3.22). Die Molekülzahl bei *skor* nimmt hierbei ab, wohingegen es bei *atkc1* zu einer Erhöhung kommt.

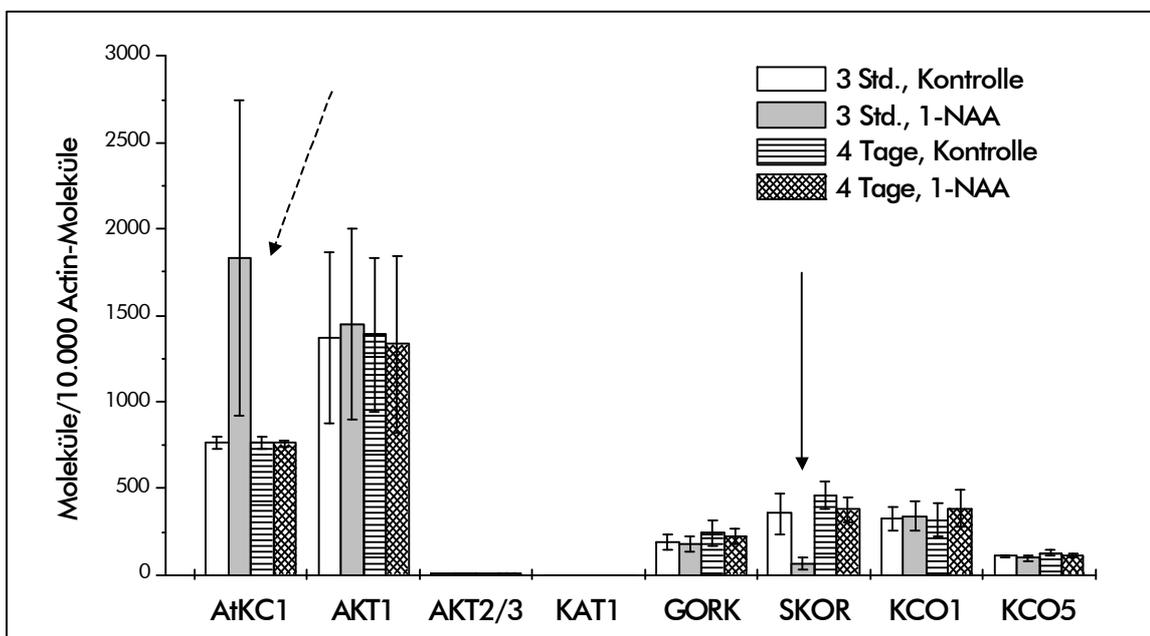
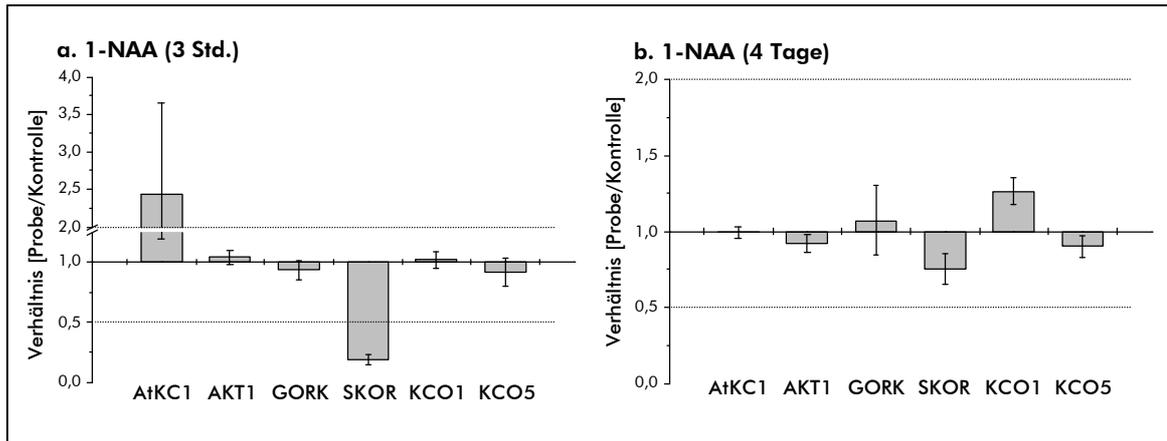


Abb. 3.22

Expression von verschiedenen Kaliumkanälen im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach 3-stündiger bzw. 4-tägiger Inkubation mit dem synthetischen Phytoeffektor 1-NAA. Die Grafik zeigt die Anzahl von K^+ -Kanal-RNA-Molekülen pro 10000 Molekülen Aktin. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) und der Standardfehler.

Um die Signifikanz der beobachteten Ergebnisse zu ermitteln, wurden auch bei diesem Versuch die Verhältnisse zwischen Probe und Kontrolle berechnet und sind in Abbildung 3.23 grafisch wiedergegeben. Die einzig signifikante Veränderung ergab sich im Kurzzeitexperiment (Abb. 3.23, Grafik a.) für SKOR, dessen Verhältniszahl mit 0,18 deutlich unter dem erforderlichen Schwellenwert von 0,5 lag. Dagegen war die starke Zunahme von AtKC1 im Kurzzeitexperiment (3 h) trotz einer Verhältniszahl von 2,4 aufgrund des hohen Standardfehlers nicht signifikant. Alle anderen untersuchten Kanäle zeigten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen.

**Abb. 3.23**

Darstellung der Molekülverhältnisse zwischen Probe und Kontrolle für die in der Wurzel vorkommenden K^+ -Kanäle nach Verabreichung von 1-NAA. Zu sehen sind Zunahme bzw. Abnahme der Expression im Kurzzeitexperiment (a. Ernte nach drei Stunden) sowie im Langzeitexperiment (b. Ernte nach vier Tagen). Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=3$) und der Standardfehler.

4 Diskussion

4.1 Kolonisierung und Aufbau der Assoziation zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum spec.*

Eine Besiedlung der Wurzeloberfläche gilt generell als erster Schritt zum Aufbau einer Assoziation zwischen Azospirillen und ihren Wirtspflanzen (Castellanos *et al.*, 1998; Yegorenkova *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der GUS- und GFP-Kolonisierungsversuche in Kapitel 3.2 zeigen, daß *Azospirillum brasilense* die Wurzel von *Arabidopsis thaliana* besiedelt. Das gefundene Kolonisierungsmuster bestätigt dabei das bereits von einigen Autoren beschriebene Muster einer Azospirillen-Besiedlung. So wurden bei *Arabidopsis thaliana*, wie bei Hirse, vorwiegend die Ausbruchstellen der Seitenwurzeln kolonisiert (Umali-Garcia *et al.*, 1980). Die Besiedlung der Wurzelhaare (Abb. 3.2) durch *Azospirillum* konnte z. B. auch bei Hirse- und Mais-Wurzeln (Michiels *et al.*, 1989) gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei *Arabidopsis* steht jedoch das Kolonisierungsmuster bei Weizenwurzeln, bei denen bevorzugt die Wurzel-Streckungszone besiedelt wird (Michiels *et al.*, 1989). Bei Weizen wurde ebenfalls der zeitliche Ablauf der Wurzelkolonisierung durch Azospirillen genauer untersucht. Der Besiedlungsvorgang besteht dabei aus zwei Phasen, dem Anheften und der Verankerung (1.2.1), und ist nach etwa 16 Stunden abgeschlossen (Bashan and Holguin, 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (3.2.1) zeigen, daß es bei *Arabidopsis* erst nach etwa 30 bis 44 Stunden zu einer festen Verankerung der Azospirillen auf der Wurzeloberfläche kommt. Der Kolonisierungsvorgang bei *Arabidopsis* dauert demnach etwa doppelt so lange wie bei Weizen. Allerdings zeigten Kolonisierungsversuche bei Hirse, daß der Besiedlungsprozeß auch bis zu 48 Stunden dauern kann (Umali-Garcia *et al.*, 1980). Das läßt darauf schließen, daß der Zeitpunkt der irreversiblen Verankerung auf der Pflanzenwurzel auch wesentlich von der Pflanzenspezies bestimmt wird. Das pflanzliche Exsudatmuster kann hierbei eine wichtige Rolle spielen (s. u.). Ein Vergleich der Kolonisierungsdichte auf der *Arabidopsis*-Wurzeloberfläche mit Abbildungen der Kolonisierung von Weizen bei Pereg-Gerk *et al.* (1998) macht deutlich, daß *Arabidopsis thaliana* schwächer besiedelt wird. Allgemein wird eine *Azospirillum*-Kolonisierung durch ein hohes Kohlenstoff/Stickstoff-(C/N)-Verhältnis begünstigt, da dieses die Bildung von Calcofluor-bindenden Polysacchariden stimuliert (Vande Broek *et al.*, 1998; Burdman *et al.*, 1998; Burdman *et al.*, 2000). Diese Polysaccharide sind am Verankerungsprozeß an der Wurzeloberfläche beteiligt. Das für die Versuche dieser Arbeit verwendete Pflanzenmedium (MS $\frac{1}{2}$ -Grundmedium, 2.2) enthält als Kohlenstoffquelle Saccharose (20 g/l). Dieses Disaccharid ist allerdings von Azospirillen nicht verwertbar (Michiels *et al.*, 1989). Ebenso kann auch der bei den Exsudatuntersuchungen pflanzlicher Reinkulturen (3.1) gefundene Zucker Mannit nicht von Azospirillen verwendet werden (Stanke, pers. Mitteilung). Dagegen wurden mit Malat und Arabinose zwei Substanzen

detektiert, die für die Bakterien als C-Quelle nutzbar sind. Da einerseits die Konzentration dieser Exsudate niedrig war und andererseits der Gehalt der Stickstoffquelle (Nitrat) mit 10 mM als hoch einzustufen ist, spricht das für ein, auf *Azospirillum* bezogen, niedriges C/N-Verhältnis. Dies könnte die eher schwache Besiedlung erklären. Hinzu kommt, daß mit Arabinose ein Zucker ausgeschieden wird, der zu einer Veränderung im Polysaccharidmuster auf der Bakterienoberfläche führt (Van Dommelen *et al.*, 1997; Burdman *et al.*, 2000). Dadurch wird die Aggregationsfähigkeit der Bakterien herabgesetzt, was ein weiterer Grund für die vergleichsweise schwache Besiedlung sein kann. Bei der Beurteilung der Besiedlungsdichte ist ferner zu berücksichtigen, daß die in der Klimakammer eingestellte Inkubationstemperatur von 23° C etwa 12° C unter der optimalen Wachstumstemperatur (35 bis 37° C) von *Azospirillen* lag (Pedrosa, 1988). Trotz der für die Bakterien suboptimalen Bedingungen sprechen die Ergebnisse der Morphologiestudien (3.3, 4.2) dafür, daß sich zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum brasilense* eine Assoziation von gegenseitigem Nutzen etablieren kann. Zum einen bildeten sich innerhalb der Inkubationszeit von 14 Tagen deutlich sichtbare Bakterienkolonien, und zum anderen zeigten auch die inokulierten Pflanzen gegenüber der nicht-inokulierten Kontrolle ein deutlich verbessertes Wachstum (3.3).

4.2 Morphologieveränderungen

4.2.1 Veränderung der *Arabidopsis*-Morphologie nach einer Inokulation mit *Azospirillen*

Die Ergebnisse der Morphologiestudie (3.3) belegen den Einfluß einer *Azospirillen*-Inokulation auf das Wurzel- und Sproßwachstum von *Arabidopsis*. Die Kolonisierung des *Arabidopsis*-Wildtyps durch drei verschiedene *Azospirillum*-Stämme ergab deutliche Unterschiede in der Morphologie (3.3.1). Die mit dem Stamm SpM7918 (IAA-Hypoproduzent) inokulierten Pflanzen zeigten dabei den größten Wachstumschub unter allen besiedelten Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 1c.). Die Hauptwurzel sowie die deutlich vermehrten Seitenwurzeln wiesen hier im Vergleich zu den durch die anderen Stämme kolonisierten Pflanzen die größte Gesamtlänge auf. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Erhöhung der Wurzel-Trockenmasse bestätigt, die bei diesen Pflanzen am deutlichsten ausfiel (3.3.6). Im Gegensatz dazu stehen allerdings die Beobachtungen, die bei Weizen nach einer Inokulation mit SpM7918 gemacht wurden (Dobbelaere *et al.*, 1999). Hier konnte keine Stimulation des Pflanzenwachstums festgestellt werden. Da sich die verwendeten *Azospirillum*-Stämme in der Produktion des Phytoeffektors IAA unterscheiden, ist anzunehmen, daß die beobachteten Wachstumsunterschiede auf Auxin zurückzuführen sind. Insbesondere bei Wurzeln ist bekannt, daß sie sehr sensitiv auf steigende IAA-

Konzentrationen reagieren (Müller *et al.*, 1998; Kerk *et al.*, 2000). Der wachstumsfördernde Effekt kehrt sich bei höheren Konzentrationen (μM -Bereich) um, so daß es zu einer Reduzierung von Wurzellänge und -masse kommt (Dobbelaere *et al.*, 1999). Die für eine Assoziation mit Azospirillen beschriebenen Wachstumseffekte sind im allgemeinen abhängig von der Inokulationsdichte, der Wirtspflanze, dem Inokulationszeitpunkt und den Kulturbedingungen (German *et al.*, 2000). Bei den Azospirillen wurde beobachtet, daß die Inokulationsdichte und damit auch die Menge an produzierter IAA entscheidend für die Förderung des Wurzelwachstums ist. Als Inokulationsdichte für *Azospirillum brasilense* werden häufig, abhängig von der Pflanzenart, 10^6 bis 10^9 cfu/ml genannt (Bashan und Levanony, 1990; Dobbelaere *et al.*, 1999). Bei den Experimenten dieser Arbeit lag die Inokulationsdichte mit $3,4 \cdot 10^8$ cfu/ml ($\hat{=} \text{OD}_{578} = 1$) bereits in einem höheren Bereich. Daher ist zu vermuten, daß bei dieser Inokulationsdichte die vom Sp7- und FT326-Stamm produzierte IAA-Menge bereits das Wurzelwachstum hemmte und damit zu Stauchungen des Wurzelsystems führte. Der IAA-unterproduzierende Stamm SpM7918 dagegen stimulierte bei dieser Bakteriendichte das Wurzelwachstum deutlich. Aufgrund dessen ist anzunehmen, daß eine wachstumshemmende IAA-Dosis durch diesen Stamm nicht überschritten wurde.

Eine Erklärung für das büschelartige Wurzelhaar-Wachstum an den Wurzelspitzen, daß nach einer Inkubation mit den *Azospirillum*-Stämmen Sp7 (Abb. 3.4, Foto b.) und FT326 (Abb. 3.4, Foto d.) beobachtet wurde, könnte in der Kombination der oben erwähnten Stauchung und der vermehrten Entstehung von Wurzelhaaren liegen. Es wird dabei vermutet, daß Auxin eine zentrale Rolle bei der Initialisierung der Wurzelhaare spielt. Wurzelhaarbildende Epidermiszellen verändern unter Auxineinfluß ihre Wachstumsrichtung vom longitudinalen Streckungswachstum zum radialen Wachstum, was zur Folge hat, daß die Zellen kürzer werden (Masucci und Schiefelbein, 1996) und zugleich die Wurzelhaare dichter zusammenstehen. Verstärkt sich dieser Effekt bei steigenden Auxinkonzentrationen immer weiter, so kommt es zu einer sehr starken Verdichtung der Wurzelhaare, die zu den beschriebenen büschelartigen Strukturen führt. Bei Stamm SpM7918 waren dagegen keine Wurzelbüschel zu beobachten (Abb. 3.4, Foto c.). Der Wurzelhaarbesatz der mit diesem Stamm inokulierten Pflanzen war gleichmäßig. Allerdings war er im Vergleich zur nicht inokulierten Kontrolle deutlich dichter. Der wachstumsreduzierende Effekt hoher Auxinkonzentrationen scheint auf das Wurzelhaarwachstum nicht zuzutreffen. Es läßt sich sogar feststellen, daß der Wurzelhaarbesatz bzw. die Wurzelhaarlänge zunimmt, je mehr Auxin zugeführt wird (3.3.5, Abb. 3.4, Foto b./d.). Dies wird bei einem Vergleich des Wurzelhaarbesatzes der durch den FT326-Stamm (Abb. 3.4, Foto d.) besiedelten Wurzeln mit dem Habitus der mit 1-NAA-behandelten Pflanzen deutlich (Abb. 3.12, Foto b. und c.). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Vergleich des *Arabidopsis*-Wildtyps (Abb. 3.3 und 3.4) mit der auxinresistenten AUX1-k.o.-Mutante (Abb. 3.3 und 3.5). Die *Azospirillum*-Stämme Sp7 und FT326 (Abb. 3.5, Foto b. und d.) verursachen bei

dieser Mutante keine Wurzelhaarbüschel mehr. Der Wurzelhaarbesatz ist eher gleichmäßig, wie bei den mit Stamm SpM7918 inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp (Abb. 3.4, Foto c.) und AUX1-k.o.-Pflanzen (Abb. 3.5, Foto c.). Der Grund dafür liegt vermutlich in der verminderten Auxin-Aufnahme, da dieser Mutante der Auxin-Influx-Carrier AUX1 fehlt (Marchant *et al.*, 1999).

AUX1 ist maßgeblich am Auxin-Transport innerhalb der Wurzel, der Seitenwurzelbildung und dem Gravitropismus beteiligt (Casimero *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002). Bei der Betrachtung des Phänotyps der inokulierten AUX1-k.o.-Mutante (Abb. 3.3, Foto 4b. bis 4d.) fällt auf, daß sich neben dem Wurzelhaarbesatz (s. o.) auch die Haupt- und Seitenwurzelmorphologie der inokulierten Pflanzen ähnelt. Die noch beim inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 1b. und 1d.) beobachtete inhibierende Wirkung hoher externer Auxinkonzentrationen bleibt bei dieser Mutante aus, was sich vor allem bei der Inokulation mit den Stämmen Sp7 und FT326 zeigt. Im Vergleich zu den nicht-inokulierten Kontroll-Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 4a.) weisen die kolonisierten AUX1-k.o.-Mutanten (Abb. 3.3, Foto 4b. bis 4d.) allerdings deutlich mehr Seitenwurzeln auf. Mit Ausnahme des agravitropen Wachstums ähnelt das Wurzelwachstum der inokulierten Mutante daher eher dem mit Stamm SpM7918 inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp (Abb. 3.3, Foto 1c.). Die verschiedenen *Azospirillum*-Stämme können bei der AUX1-k.o.-Mutante das gravitrope Wachstum nicht wieder herstellen.

Die Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten *Azospirillum*-Stämmen scheint bei der AtKC1-k.o.-Mutante am stärksten ausgeprägt zu sein (Abb. 3.3, Foto 2b. bis 2d.). Die durch Auxin verursachte Reduzierung des Wurzelwachstums zeigt sich hier bereits bei den mit Stamm SpM7918 inokulierten Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 2c.). Am deutlichsten ist der inhibierende Effekt nach Inokulation mit dem FT326-Stamm (Abb. 3.3, Foto 2d.). Die Wurzeln sind hier so stark gestaucht, daß es vermutlich als Sekundäreffekt auch zu einer deutlichen Reduzierung des Sproßwachstums kommt. Der Habitus der besiedelten AtKC1-k.o.-Pflanzen deutet an, daß durch das Fehlen des K⁺-Aufnahmekanals AtKC1 die Effizienz der K⁺-Aufnahme bei diesen Pflanzen möglicherweise gestört ist, so daß die Pflanzen für den durch die Bakterien verursachten Wachstumsschub nicht die erforderliche K⁺-Aufnahmekapazität bereitstellen können. Die Besiedlung der SKOR-k.o.-Mutante mit den *Azospirillum*-Stämmen führte zu einem Phänotyp (Abb. 3.3, Foto 3b. bis 3d.), der den inokulierten Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 1b. bis 1d.) ähnelte. Dies läßt darauf schließen, daß SKOR an der Ausprägung der beobachteten Morphologieveränderungen im Zuge der Assoziation nicht maßgeblich beteiligt ist.

Ein Vergleich der Sproßmorphologien aller inokulierten Verlust-Mutanten (Abb. 3.3) mit denen des inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyps zeigt, daß sich die Sproßhabita (mit Ausnahme von AtKC1-k.o. [Abb. 3.3, Foto 2d.]) kaum unterscheiden. Bei allen inokulierten Pflanzen ist der Sproß positiv beeinflusst. Dies bestätigen auch die Sproßtrockengewichte der inokulierten Wildtyp-Pflanzen (3.3.6). Da der Sproß im Gegensatz zu den Wurzeln nicht von Bakterien besiedelt war, ist die Wachstums-

förderung des Sprosses bei den inokulierten Pflanzen vermutlich zum Teil eine Folge der Wurzelproliferation. Insbesondere der verstärkte Wurzelhaarbesatz und die damit einhergehende Vergrößerung der Wurzeloberfläche führt zu einer verbesserten Mineralstoffaufnahme (Gilroy und Jones, 2000; Lin *et al.*, 1983; Okon und Kapulnik, 1986). Zum anderen kann auch bakteriell produzierte Gibberellinsäure ein Grund für das verbesserte Sproßwachstum sein (vgl. 4.2.2), so daß letztendlich mehrere Faktoren für die beobachteten Morphologieveränderungen verantwortlich sind. Dadurch profitiert schließlich die gesamte Pflanze von einer Besiedlung der Wurzel durch Azospirillen.

Die Besiedlung durch Bakterien muß sich nicht immer positiv auf das Pflanzenwachstum auswirken. Dies demonstriert sehr deutlich der Kolonisierungsversuch mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* (3.3.7). Die Fotos 1 und 5 in Abb. 3.7 verdeutlichen, daß die mit *Ralstonia* inokulierten Pflanzen stark in ihrem Wachstum eingeschränkt wurden. Eine Ko-Inokulation mit Azospirillen konnte den schädigenden Einfluß des Phytopathogens zwar nicht verhindern, jedoch teilweise abschwächen. Diese Beobachtung läßt sich dadurch erklären, daß Azospirillen als typische Vertreter der PGPR (1.1) das Wachstum einer Pflanze nicht nur direkt (z. B. durch die Abgabe von Phytoeffektoren), sondern auch indirekt fördern. Das häufigste Beispiel, das im Zusammenhang mit indirekter Wachstumsförderung von Pflanzen genannt wird, ist die Verhinderung der schädigenden Wirkung bzw. die Verdrängung eines Pathogens (Schroth und Hancock, 1982; Bashan und de-Bashan, 2002). Für Azospirillen wurde nachgewiesen, daß dies durch die Ausscheidung von Sekundärmetaboliten wie Bakteriocine oder Siderophore erfolgt (Oliveira und Drozdowicz, 1981). Auch die Konkurrenz um Nährstoffe in der Rhizosphäre und um Besiedlungsstellen auf der Wurzeloberfläche kann das Pathogen verdrängen (Timmusk und Wagner, 1999). Martinez Noél *et al.* (2001) haben gezeigt, daß die Behandlung einer Pflanze mit dem Phytoeffektor IAA ebenfalls vor Pathogenbefall schützen kann. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bakteriell produziertes Auxin auch in den Versuchen dieser Arbeit die pathogene Wirkung von *Ralstonia* hemmt. Daß die Azospirillen in Versuch 3.3.7 das Pathogen nicht stärker verdrängt haben, ist wahrscheinlich auf die zeitgleiche Inokulation zurückzuführen. Eine deutlichere Pathogenabwehr wäre vermutlich erzielt worden, wenn die Azospirillen die Pflanzenwurzel bereits vor einer Inokulation mit *Ralstonia* besiedelt hätten. Timmusk und Wagner (1999) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß zuvor mit PGPR inokulierte *Arabidopsis*-Pflanzen resistenter gegen einen späteren Pathogenbefall waren.

4.2.2 Imitierung der bakteriell verursachten Morphologieveränderungen

Nach den Inokulationsversuchen sollten Versuche mit potentiellen bakteriellen Ausscheidungsprodukten zeigen, ob diese die beobachteten Wachstumseffekte imitieren können. Zunächst wurde dabei untersucht, ob wurzelassoziierte Azospirillen

Stickstoff fixieren und wie sich Ammonium als Produkt der Stickstofffixierung auf die Morphologie auswirkt. Die Ergebnisse von Kapitel 3.4.1 belegen, daß wurzellosoziierte Azospirillen nach 14-tägiger Inkubation mit *Arabidopsis thaliana* Stickstoff fixieren. Ein deutliches Zeichen dafür ist die beobachtete *nifH*-Expression, die nachweislich mit der Stickstofffixierung positiv korreliert (Deaker und Kennedy, 2001). Die Tatsache, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen (3.4.1) Stickstofffixierung stattfinden kann, erscheint zunächst erstaunlich, da bekannt ist, daß Azospirillen nur bei Mangel an gebundenem Stickstoff und unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck Stickstoff fixieren können (Michiels *et al.*, 1989). Das bei den Versuchen eingesetzte MS $\frac{1}{2}$ -Grundmedium (2.2) enthält mit Nitrat zunächst aber eine Stickstoffquelle. Des weiteren ist das Bakterium mit einem photosynthetisch-aktiven und somit Sauerstoff produzierenden Organismus ko-inkubiert. Da sowohl *Azospirillum* als auch *Arabidopsis thaliana* über die genetische Ausstattung verfügen, Nitrat aufzunehmen und zu assimilieren, muß angenommen werden, daß nach einer 14-tägigen Inkubationszeit die Stickstoffquelle vor allem im wurzelnahen Bereich erschöpft ist und deshalb die reprimierende Wirkung auf die Nitrogenase nicht mehr erfolgt (Pedrosa, 1988; Oliveira *et al.*, 1997; Crawford und Glass, 1998; Daniel-Vedele *et al.*, 1998). Es ist ferner bekannt, daß Azospirillen Aggregate („Flocken“) bilden, in denen der Sauerstoffpartialdruck niedriger ist als in der Umgebung (Burdman *et al.*, 1999; Michiels *et al.*, 1989). Hinzu kommt, daß die Pflanzenwurzeln nicht photosynthetisch-aktiv sind, sondern durch Atmung Sauerstoff verbrauchen, so daß der Sauerstoffpartialdruck im Wurzelbereich nicht schädigend für die Stickstofffixierung wäre. Die *nifH*-Aktivität wurde fast ausschließlich in den Bereichen dichteren Wurzelhaarbesatzes festgestellt (Abb. 3.8, Foto b.). Auch dies läßt die Vermutung zu, daß sich hier eine Nische mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck bilden kann. Ob die Azospirillen den fixierten Stickstoff direkt in Form von Ammonium an die Pflanzen abgeben, und ob dies morphologische Veränderungen an der Pflanze zur Folge hatte, zeigen die Ergebnisse in Kapitel 3.4.2. Es wird deutlich, daß Ammonium selbst die Morphologie der Pflanzen wenig beeinflußt und daher nicht als potentieller Verursacher der beobachteten positiven Wachstumseffekte in den Inokulationsversuchen in Frage kommt. Ob fixierter Stickstoff in einer anderen Form an die Pflanze abgegeben wird, konnte mit diesem Versuch nicht geklärt werden. Interessant ist allerdings, daß sich die Zugabe von Ammoniumchlorid bei diesem Experiment negativ auf die Assoziation von Pflanze und Bakterium auswirkte (Abb. 3.9). In diesem Zusammenhang fällt besonders auf, daß die Bakterien auf der Pflanzenwurzel nicht erkennbar gewachsen sind. Die Vermutung, daß das Ammonium toxisch auf das Bakterienwachstum wirkt, läßt sich jedoch dadurch entkräften, daß sowohl die eingesetzte NH_4^+ -Konzentration (10 mM) als auch die Ammoniumquelle (NH_4Cl) der Zusammensetzung des für Azospirillen spezifischen Bakterien-Kulturmediums NFb (2.2) entnommen wurden. Im Hinblick auf die Pflanzen ist bekannt, daß eine Aufnahme von Ammonium über die Wurzeln zu einer Ansäuerung des umgebenen Mediums führt (Walch-Liu und Engels, 1998).

Ebenfalls ist bekannt, daß eine Veränderung des pH-Wertes in der Rhizosphäre einen Einfluß auf das Exsudatmuster hat (Marschner *et al.*, 1986; Marschner, 1998). Deshalb ist zu vermuten, daß das beobachtete schwache Bakterienwachstum auf eine pH-Wert-Veränderung im wurzelnahen Bereich und/oder auf eine Veränderung des pflanzlichen Exsudatmusters zurückzuführen ist, so daß sich die Wachstumsbedingungen für die Azospirillen nachteilig veränderten. Als Konsequenz des reduzierten bakteriellen Wachstums konnten die Pflanzen nur schwach von der Gegenwart der Bakterien profitieren und zeigten deshalb keine deutlich veränderte Morphologie.

Der Versuch, die durch Azospirillen veränderte Morphologie (3.3) mit Hilfe von exogen verabreichten Phytoeffektoren zu imitieren, war dagegen erfolgreich. Der durch Gibberellinsäure beobachtete Effekt beim Sproßwachstum in Kapitel 3.4.3 gibt einen Hinweis darauf, daß die bei den Inokulationsversuchen (3.3, Abb. 3.3) beobachteten Sproßhabita auf diesen Phytoeffektor zurückzuführen sein könnten. Dies bestätigt die Tatsache, daß Azospirillen neben Auxinen auch Gibberelline an die Pflanze abgeben können (Bottini *et al.*, 1989; Janzen *et al.*, 1992). Zusätzlich belegen die Ergebnisse der Gibberellinsäure-Versuche in Kapitel 3.4.3, daß dieser Phytoeffektor keinen wesentlichen Einfluß auf die Wurzelmorphologie hat. Daraus folgt, daß die nach einer Azospirillen-Inokulation beobachtete Wurzelproliferation nicht durch bakterielle Gibberellinsäure verursacht wurde. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit dem synthetischen Phytoeffektor 1-NAA (3.4.4) bei *Arabidopsis thaliana* zu einer Wurzelmorphologie, die Ähnlichkeiten mit der Morphologie nach einer *Azospirillum*-Inokulation aufwies. Diese zeigten sich beim Wurzelhaarbesatz (Abb. 3.12) sowie bei der Wurzellänge (Abb. 3.11). Steigende 1-NAA-Konzentrationen bewirkten ebenfalls eine zunehmende Stauchung der *Arabidopsis*-Haupt- und Seitenwurzeln. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die vor allem nach Inkubation mit *Azospirillum*-Stamm Sp7 und FT326 aufgetretenen Stauchungen, tatsächlich auf zu hohe bakterielle Auxinausscheidungen zurückzuführen sind. Auch der Wurzelhaarbesatz nimmt mit steigenden 1-NAA-Konzentrationen zumindest im Bereich von 100 nM bis 1 μ M zu. Deutlich wird allerdings, daß das Sproßwachstum (bei inokulierten Pflanzen) nicht direkt mit der 1-NAA-Behandlung zusammenhängt, da die mit exogen verabreichten 1-NAA behandelten Pflanzen keine Steigerung des Sproßwachstums im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle zeigten (Abb. 3.11). Die Behandlung der verschiedenen *Arabidopsis*-Verlust-Mutanten mit 0,5 μ M 1-NAA in Versuch 3.4.4.2 ergab einen Wurzelhabitus, der den mit Bakterien kolonisierten Pflanzen ähnelte (vgl. Abb. 3.13 mit Abb. 3.3). Hier zeigte die 1-NAA-behandelte AtKC1-k.o.-Mutante gegenüber gleich behandelten Wildtyp-Pflanzen eine empfindlichere Reaktion auf den Phytoeffektor, denn das Wurzelsystem war auch hier (vgl. 4.2.1) gestauchter. Die SKOR-k.o.-Mutante glich dem mit 1-NAA-behandelten Wildtyp und unterstützt somit die These, daß SKOR für die Ausprägung der Wurzelmorphologie nach einer Inokulation nicht entscheidend ist. Die AUX1-k.o.-Mutante zeigte in Gegenwart von 1-NAA ein verbessertes Wurzelwachstum. Im

Gegensatz zu den inokulierten Pflanzen ist bei diesen Pflanzen jedoch der Gravitropismus wieder hergestellt. Dies erklärt sich dadurch, daß 1-NAA im Gegensatz zu IAA für die Aufnahme in die Zelle keinen Carrier benötigt, sondern mittels Diffusion durch die Zellmembran gelangt. Daher kann dieses synthetische Auxin seine Wirkung auf den Gravitropismus in diesen Pflanzen entfalten (Marchant *et al.*, 1999).

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse aus Versuch 3.4 zeigt, daß die Behandlung der Pflanzen mit jeweils einem potentiellen Bakterienausscheidungsprodukt nicht zu einer vollständigen Imitierung der Morphologie nach einer Inokulation führt. Die Ergebnisse des Gibberellinsäure- und 1-NAA-Versuchs legen die Vermutung nahe, daß sowohl bakteriell produzierte Auxine als auch Gibberelline an der Ausbildung der beobachteten Morphologieveränderungen beteiligt sind. Es ist jedoch anzunehmen, daß neben den untersuchten Substanzen noch weitere Stoffe bakteriellen Ursprungs an der assoziativen Interaktion beteiligt sind und daß die beobachtete Wachstumsförderung letztendlich das Ergebnis einer Vielzahl von Faktoren darstellt.

4.3 Veränderung des Auxingehalts in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* nach Inokulation mit *Azospirillum spec.*

Daß eine Azospirillen-Inokulation neben den morphologischen Veränderungen auf makroskopischer Ebene auch im molekularen Bereich die *Arabidopsis*-Wurzel beeinflusst, bestätigen die Ergebnisse der GUS-Versuche mit der auxinsensitiven Mutante, sowie die Untersuchung der Expression des Auxin-Influx-Carriers AUX1 in Kapitel 3.5. Bei der DR5::GUS-Mutante handelt es sich um ein äußerst empfindliches System, da sich erste Blaufärbungen bereits bei einer Auxinkonzentration von 10 nM nachweisen lassen (Sabatini *et al.*, 1999). Die Färbung nimmt bis zu einer Konzentration von 10 μ M an Intensität zu und bleibt bei weiter steigenden Konzentrationen konstant (Sabatini *et al.*, 1999). Die GUS-Färbung (3.5.1) der nicht-inokulierten Kontroll-Pflanzen (Abb. 3.14, Foto a.) bestätigt die Ergebnisse von Sabatini *et al.* (1999), wonach freies, aktives Auxin vor allem in der distalen Region des Wurzelmeristems, also in den Wurzelspitzen lokalisiert ist. Die in den inokulierten Pflanzen (Abb. 3.14, Foto b. bis d.), vor allem bei dem IAA-hyperproduzierenden *Azospirillum*-Stamm FT326 (Abb. 3.14, Foto d.), vermehrten und intensiver auftretenden Blaufärbungen sprechen dafür, daß sich der Auxingehalt in der *Arabidopsis*-Wurzel in Gegenwart von Azospirillen tatsächlich erhöht. Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung des Auxingehalts wäre, daß die pflanzliche Auxinsynthese durch die wurzelassoziierten Bakterien stimuliert wird. Pflanzen produzieren Auxin jedoch vor allem in jungen Blättern, von wo aus das Auxin über

eine lange Distanz zu den Wirkorten in die Wurzel transportiert wird (Dolan, 1998). Dieser basipetale Auxintransport ist zudem ein energieverbrauchender Prozeß (Palme und Gälweiler, 1999). Es ist daher wahrscheinlicher, daß die Pflanzen das bakteriell produzierte Auxin direkt aufnehmen, dieses akkumulieren und dadurch die stärkeren Blaufärbungen aufweisen. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die Beobachtungen von Sabatini *et al.* (1999), die gezeigt haben, daß sich DR5::GUS-Pflanzen auch nach externer Zugabe von Auxinen blau anfärben. Ferner sind die intensiveren Färbungen, die in dieser Arbeit auftraten, vor allem an den Ausbruchstellen von Seitenwurzeln zu beobachten sowie an den Stellen, an denen eine Seitenwurzel gebildet wird (Abb. 3.15). Erkennbar ist dies durch kreisförmige, in regelmäßigen Abständen auftretende Blaufärbungen im Zentralzylinder, dem Ursprung der endogen entstehenden Seitenwurzeln (Reed *et al.*, 1998; vgl. Abb. 1.1). Diese Bereiche sind letztlich identisch mit den Stellen, an denen Azospirillen im Kolonisierungsversuch (3.2) nachgewiesen wurden und sind ein weiteres Indiz für den bakteriellen Ursprung des nachgewiesenen Auxins.

Auch die untersuchte Expression des Auxin-Influx-Carriers AUX1 (3.5.2) bestätigt die molekularen Veränderungen in der *Arabidopsis*-Wurzel durch eine *Azospirillum*-Besiedlung. Die Ergebnisse hierzu belegen, daß nach der Inkubation mit Bakterien eine Blaufärbung nicht nur an den Wurzelspitzen (Abb. 3.16, Foto a., nicht-inokulierte Kontrolle), sondern auch an der Basis der austretenden Seitenwurzeln auftritt (Abb. 3.17, Foto b. bis d.) und somit genau an den Stellen, die von den Azospirillen bevorzugt besiedelt werden (3.2). De Billy *et al.* (2001) zeigten, daß AUX1 vor allem in den Wurzelspitzen, aber auch in der Wurzel-Epidermis exprimiert wird. Ein Vergleich der Expression des Auxintransporters mit dem Vorkommen von Auxin in der Wurzel macht deutlich, daß an Stellen hoher Auxinkonzentration auch der AUX1-Transporter vorkommt. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß AUX1 an der Einschleusung bakteriellen Auxins in die *Arabidopsis*-Wurzel beteiligt sein könnte, und daß es sich bei AUX1 möglicherweise um einen induzierbaren Transporter handelt. Über eine Induktion der *aux1*-Expression durch Auxin ist bislang allerdings nichts bekannt.

4.4 Expression von K⁺-Kanälen in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana*

Die Morphologie-Versuche in Kapitel 3.3 zeigten eine makroskopisch deutlich sichtbare Wurzelproliferation nach einer Azospirillen-Inokulation. Da K⁺-Ionen einen essentiellen Einfluß auf Wachstumsprozesse haben (Hedrich *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998), sollten die Expressionsanalysen in Kapitel 3.6 klären, ob die Steigerung der Wurzelmasse auch mit einer Veränderung der in der Wurzel exprimierten K⁺-Kanäle einhergeht. Die zunächst durchgeführte *in situ*-Analyse (3.6.1) mit der AtKC1p::GUS-Mutante sollte helfen, die Expression von AtKC1, einem

K⁺-Aufnahmekanal, direkt im pflanzlichen Gewebe zu verfolgen. Die in Abb. 3.18 dargestellten Fotos zeigten allerdings sowohl bei der nicht inokulierten Kontrolle (Abb. 3.18, Foto a.) als auch bei den mit Bakterien inkubierten Wurzeln (Abb. 3.18, Foto b. bis d.) keinerlei bzw. nur sehr diffuse Blaufärbungen, so daß eine Lokalisation der Expression nicht möglich war. Im Gegensatz dazu stehen die von Reintanz *et al.* (2002) erzielten Ergebnisse mit dieser *Arabidopsis*-Mutante. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die Expression von AtKC1 vorwiegend in den Wurzelhaaren und in der Endodermis erfolgt und somit an Schlüsselstellen für den Übergang vom apoplastischen zum symplastischen Transport auftritt. In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von *atkc1*-Transkripten in der Wurzel erst mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse (3.6.2). Die Ergebnisse (Abb. 3.19) zeigten keine signifikante Zu- bzw. Abnahme an *atkc1*-Transkripten im untersuchten Zeitrahmen von 10 bis 48 Stunden in Gegenwart von Azospirillen. Daraus läßt sich schließen, daß die Bakterien zumindest in diesem Zeitraum und unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf die Expression von AtKC1 haben. Dubrovsky *et al.* (1994) konnten an *Arabidopsis*-Wurzeln zeigen, daß eine 48-stündige Azospirillen-Inkubation bereits eine Verlängerung der Wurzelhaare zur Folge hatte. Ebenso konnten Hadas und Okon (1987) an Tomatenkeimlingen beobachten, daß eine vermehrte Wurzelhaarbildung bereits 12 bis 48 Stunden nach einer *Azospirillum*-Inokulation auftrat. Da AtKC1 in Wurzelhaaren exprimiert wird (s. o.), korreliert dessen Expression offensichtlich nicht mit einer Azospirillen-Inokulation. Auch für den K⁺-Aufnahmekanal AKT1 zeigten sich im Rahmen der Northern-Blot-Analysen keine Expressionsunterschiede nach einer Inokulation (vgl. 3.6.2). SKOR, ein in der Wurzel lokalisierter K⁺-Abgabekanal, konnte aufgrund zu niedriger Transkriptmengen mit dieser Analyse-Methode nicht nachgewiesen werden. Daher wurden die Expressionsanalysen mit dem LightCycler-System fortgesetzt (3.6.3). Neben AKT1, AtKC1 und SKOR wurden die in der Wurzel schwächer exprimierten Kanäle GORK, KCO1 und KCO5 untersucht. Zusätzlich wurden als Negativkontrollen die ausschließlich im Sproß lokalisierten K⁺-Kanäle AKT2/3- und KAT1 eingesetzt. Im Gegensatz zu den Northern-Blot-Experimenten wurde die Inkubationszeit der Pflanzen mit den Azospirillen aus folgenden Gründen auf neun Tage verlängert. Zum einen war zu diesem Zeitpunkt die Kolonisierung bereits so weit fortgeschritten, daß die beschriebene Wurzelproliferation (4.2.1) deutlich sichtbar war und die Pflanze sich gewissermaßen im „Stadium der Wachstumsförderung“ befand. Zum anderen zeigte sich in den Morphologie-Experimenten (3.3), daß sich nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen häufig schon größere Bakterienkolonien auf der Wurzel bildeten und ein Teil der Wurzelhaare derart im Untergrund verankert war, daß ein Ablösen bei der Ernte die Wurzelhaare abgerissen hätte.

Die ermittelten Molekülzahlen der LightCycler-Experimente in Abbildung 3.20 bestätigen für die nicht-inokulierten Kontrollen das erwartete Expressionsmuster der untersuchten Kanäle. So konnten erwartungsgemäß AKT2/3 und KAT1 sowohl in

den Kontrollpflanzen als auch in den inokulierten Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Der mit Abstand am stärksten exprimierte Kanal in der Wurzel war AKT1. Dieser gilt als der vorherrschende K^+ -Kanal in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana*, der funktionell vor allem für die niedrigaffine Aufnahme von K^+ -Ionen in den Symplasten verantwortlich ist (Maathuis und Sanders, 1999; Czempinski *et al.*, 1999). Seine Expression ist nicht von der externen K^+ -Konzentration abhängig (Schachtman, 2000) und wird auch in K^+ -freien Medien nicht reprimiert (Basset *et al.*, 1995). Neben AKT1 findet sich auch ein großer Anteil an AtKC1-Transkripten in den Kontrollpflanzen. In Anbetracht der Funktion von AtKC1 als α -Untereinheit eines Heteromers mit AKT1 (Reintanz *et al.*, 2002) hat AtKC1 einen bedeutenden Anteil an der K^+ -Aufnahme in die Wurzel. In den inokulierten Pflanzen findet sich jedoch unabhängig vom verwendeten *Azospirillum*-Stamm weder bei AKT1 noch bei AtKC1 eine signifikante Veränderung der Expression (Abb. 3.21). Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen der Northern-Blot-Analysen. Die bisher bekannten Hauptaufnahmekanäle in der *Arabidopsis*-Wurzel sind daher wohl auch langfristig nicht an der durch die Bakterien ausgelösten Wurzelproliferation beteiligt. Der Vakuolenkanal KCO1 und der sequenzzhomologe K^+ -Kanal KCO5 konnten ebenfalls in der *Arabidopsis*-Wurzel nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Allerdings konnten von KCO5 nur geringe Transkriptmengen detektiert werden. Bei beiden Kanälen ergab sich jedoch zu diesem Zeitpunkt der Assoziation (neun Tage nach Inokulation) keine signifikante Veränderung im Expressionsmuster (Abb. 3.21). Demzufolge spielen auch diese Kanäle vermutlich keine Rolle bei der Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum brasilense*.

Mit GORK und SKOR wurden schließlich die beiden einzigen bislang identifizierten Kanäle vom Shaker-Typ getestet, die den K^+ -Efflux vermitteln und durch die Depolarisation der Plasmamembran aktiviert werden (Gaymard *et al.*, 1998; Ache *et al.*, 2000). Während GORK für den K^+ -Export aus den Schließzellen verantwortlich ist (Mäser *et al.*, 2001), aber auch in Wurzelhaarprotoplasten gefunden wurde (Reintanz *et al.*, 2002), wird SKOR ausschließlich im Xylemparenchym exprimiert (Maathuis und Sanders, 1999). SKOR ist hier zuständig für die Translokation von K^+ -Ionen in das Xylem und somit in den oberirdischen Teil der Pflanze (Gaymard *et al.*, 1998; Lacombe *et al.*, 2000; Schachtman, 2000). Sowohl GORK als auch SKOR wurden im Rahmen der LightCycler-Experimente in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* gefunden (Abb. 3.20). Während GORK bei den Kontroll- und auch bei den inokulierten Pflanzen auf einem niedrigen Niveau (82 bis 117 Moleküle) exprimiert war, stellte SKOR den immerhin drittgrößten Anteil aller getesteten Kanäle in der Wurzel (Abb. 3.20). Dieser Anteil reduzierte sich signifikant in Gegenwart aller drei verwendeten *Azospirillum*-Stämme (Abb. 3.21). Aufgrund der statistischen Signifikanz ist davon auszugehen, daß die Repression von SKOR eine Folge der Assoziation ist. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten Expressionsergebnisse nach einer *Azospirillum*-Inokulation legt die Vermutung nahe, daß die für die Wurzelproliferation (Kap. 3.3) benötigten K^+ -Ionen nicht durch eine

erhöhte K^+ -Aufnahme aus dem Boden zur Verfügung standen, sondern durch eine Hemmung der K^+ -Translokation in den Sproß. Diese These steht nicht im Widerspruch zu den Erkenntnissen von Gaymard *et al.* (1998), der in SKOR-k.o.-Mutanten zwar einen um die Hälfte reduzierten K^+ -Gehalt im Sproß, aber keine K^+ -Akkumulation in der Wurzel messen konnte. Da nach der beobachteten Repression von SKOR vermutlich weniger K^+ -Ionen in den Sproß transportiert werden, könnten die in der Wurzel verbleibenden K^+ -Ionen dort für Wachstumsvorgänge zur Verfügung stehen. Da die K^+ -Aufnahmesysteme in der Wurzel (AKT1, AtKC1) zudem nicht reprimiert werden, ist denkbar, daß K^+ -Ionen weiter aus dem Boden aufgenommen werden und die K^+ -Akkumulation letztendlich durch fortwährendes Wurzelwachstum verhindert wird. Trotz einer vermutlich verminderten K^+ -Translokation in die oberirdischen Pflanzenteile, konnte ein deutlich verbessertes Sproßwachstum beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür gibt De Boer (1999), der nachgewiesen hat, daß anstelle von K^+ vermehrt Ca^{2+} in den Sproß transportiert wird, welches dort die Funktion von K^+ als osmotisch aktives Ion übernimmt.

Seit der ersten Veröffentlichung im Jahr 1998 (Gaymard *et al.*) ist nur wenig über die Regulation von SKOR auf Transkriptionsebene bekannt geworden. Eine Reprimierung der *skor*-Expression, wie sie in dieser Arbeit festgestellt wurde, konnte von Gaymard *et al.*, (1998) nach Behandlung mit dem Phytoeffektor Abscisinsäure (ABA) beobachtet werden. Dabei war innerhalb von 30 Minuten nach ABA-Verabreichung die *skor*-Expression bereits deutlich reduziert und nach drei Stunden waren keine *skor*-Transkripte mehr nachweisbar. Dieser relativ schnelle *turnover* spricht laut Tester (1999) dafür, daß einer Kontrolle der K^+ -Translokation in den Sproß mehr Bedeutung beizumessen ist als einer Kontrolle der K^+ -Aufnahme aus dem Boden. Vom Phytoeffektor Abscisinsäure ist bekannt, daß dieser eine Rolle bei der Anpassung der Pflanzen an Streßsituationen spielt (Zimmermann *et al.*, 1999; Gehring *et al.*, 1990). Belegt ist diese Funktion zumindest für Wasserstreß, durch den der Abscisinsäuregehalt in der Pflanze ansteigt (Tester, 1999; Roberts, 1998). Auf physiologischer Ebene wird daraufhin innerhalb von Minuten die K^+ -Ionenabgabe an das Xylem gehemmt, so daß die osmotisch wirksamen Ionen in der Wurzel verbleiben. Dadurch gelingt es der Pflanze, den Turgor im Wurzelgewebe aufrecht zu erhalten und über das Wurzelwachstum ggf. neue Wasserquellen im Boden zu erschließen. Im Sproß dagegen stimuliert ABA den Ausstrom von K^+ -Ionen aus den Schließzellen. Infolgedessen sinkt der Turgor in diesen Zellen, woraufhin sich die Stomata schließen und der Transpirationsstrom abnimmt (Zimmermann *et al.*, 1999). Damit bewirkt ABA in den Blättern bezüglich des K^+ -Ionenstroms genau den gegenteiligen Effekt. Eine Regulation von K^+ -Kanälen durch ABA auf transkriptioneller Ebene, wie sie in der Wurzel bei SKOR beobachtet wurde, konnte in den Schließzellen bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Tester, 1999). Ein Vergleich der Literatur mit den Inokulationsexperimenten dieser Arbeit legt nahe, daß die Reprimierung von SKOR auch hier durch den Phytoeffektor ABA erfolgt sein

könnte. Damit käme die Kolonisierung der Wurzel durch *Azospirillum brasilense* einer Streßsituation für *Arabidopsis thaliana* gleich, die wiederum die Bildung von ABA stimulieren würde. Bei Untersuchungen an Maiswurzeln konnte Roberts (1998) zeigen, daß ABA keinen Einfluß auf die K^+ -Aufnahme in die Wurzel ausübt. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, daß ABA bei den Kolonisierungsexperimenten mit Azospirillen involviert sein könnte. Einerseits zeigte sich die Expression der K^+ -Aufnahme-Systeme AKT1 und AtKC1 unbeeinflußt und andererseits wurde das K^+ -Abgabe-System SKOR gehemmt. Die Hemmung von SKOR auf transkriptioneller Ebene konnte in der vorliegenden Arbeit auch durch die Zugabe des synthetischen Auxins 1-NAA erreicht werden (3.6.3.2). Den Auxinen kommt im Rahmen der Inokulations-Experimente mit Azospirillen eine besondere Rolle zu, da sie zu den nachgewiesenen Ausscheidungsprodukten dieser Bakterien gehören. Daher wurden die K^+ -Kanäle aus dem Expressionsversuch mit den Azospirillen (3.6.1) auch auf ihr Expressionsverhalten gegenüber 1-NAA getestet. Abgesehen von SKOR zeigten die übrigen Kanäle keine signifikante Veränderung der Expression. Bei SKOR kam es binnen drei Stunden (Abb. 3.23, Grafik a.) zu einer deutlichen Abnahme der Transkripte. Nach vier Tagen Inkubation mit 1-NAA (Abb. 3.23, Grafik b.) war jedoch gegenüber der Kontrolle kein signifikanter Unterschied mehr erkennbar. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß auch Auxine neben dem Phytoeffektor ABA in der Lage sind, zumindest kurzfristig den K^+ -Export in den Sproß zu reduzieren. Wie nach einer ABA-Behandlung (Gaymard *et al.*, 1998) ergab sich auch in der vorliegenden Arbeit ein sehr schneller *turnover* an SKOR-Transkripten, da diese nach 3-stündiger Behandlung mit 1-NAA kaum noch nachzuweisen waren. Bei der Deutung des Langzeit-Experiments ist zu berücksichtigen, daß sich Nähr- oder Botenstoffe, wie 1-NAA, auf Agarplatten nach einigen Tagen erschöpfen (Koyama *et al.*, 1995), während im Vergleich dazu Azospirillen kontinuierlich Auxin produzieren und an die Pflanze abgeben. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Pflanzen des Langzeit-Experiments zum Zeitpunkt der Ernte keinem 1-NAA mehr ausgesetzt waren. Um diese Problematik zu umgehen, wäre es nötig, die Pflanzen während der Inkubationsphase regelmäßig auf frisches Medium zu transferieren. Einen Zusammenhang zwischen Auxinen und der ABA-Synthese konnten Hansen und Grossmann (2000) bei Untersuchungen an *Galium*-Pflanzen feststellen. Demnach stimulieren hohe Konzentrationen an Auxin die ABA-Synthese über den Phytoeffektor Ethylen. Die bei diesen Experimenten eingesetzte Auxin-Konzentration lag bei 0,5 mM, während die *Arabidopsis*-Pflanzen in der vorliegenden Arbeit einer 1-NAA-Konzentration von 0,5 μ M ausgesetzt waren (3.6.3.2). Es ist daher eher unwahrscheinlich, daß das Verhalten von SKOR auf einen durch 1-NAA verursachten ABA-Effekt zurückzuführen ist. Dennoch ist bei allen Experimenten mit exogen applizierten Auxinen zu berücksichtigen, daß Pflanzen aufgrund ihrer Morphologie und Größe unterschiedlich sensitiv auf Auxinmengen reagieren können (Östin *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998). So toleriert eine verhältnismäßig robuste Pflanze wie das Labkraut (*Galium*) möglicherweise höhere Auxin-Konzentrationen als *Arabidopsis*.

Es gibt bereits Erkenntnisse, daß die Expression von K^+ -Kanälen direkt durch Phytoeffektoren gesteuert werden kann. Für den in der Maiskoleoptile gefundenen K^+ -Aufnahmekanal ZMK1 konnte die Induzierbarkeit durch Auxin nachgewiesen werden (Philippar *et al.*, 1999). Hier war bereits eine Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ ausreichend, um eine Induktion des Kanals zu bewirken. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß SKOR neben ZMK1 der zweite bislang identifizierte K^+ -Kanal ist, dessen Expression über Auxine gesteuert wird. Im Gegensatz zu ZMK1 wird SKOR jedoch durch Auxine reprimiert. In diesem Zusammenhang hat schon Roberts (1998) vermutet, daß die in Mais beobachtete Reduktion der K^+ -Ionenabgabe in den Sproß nicht allein durch ABA gesteuert sein kann, sondern daß auch andere pflanzliche Signalmoleküle wie Auxine oder Cytokinine eine Rolle spielen müßten.

Aus den Morphologie-Experimenten mit der SKOR-k.o.-Mutante wurde anfänglich geschlossen, daß SKOR für die Ausprägung der Wurzelmorphologie nicht entscheidend ist (4.2.1). Die mit Azospirillen besiedelten SKOR-k.o.-Mutanten (Abb. 3.3, Foto 3b. bis 3d.) waren den kolonisierten Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.3, Foto 1b. bis 1d.) morphologisch, besonders hinsichtlich des Seitenwurzelnwachstums und des Wurzelhaarbesatzes am ähnlichsten. Durch das Expressionsverhalten von SKOR ist diese Beobachtung nun erklärbar. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen haben gezeigt, daß inokulierten *Arabidopsis*-Pflanzen der K^+ -Kanal SKOR aufgrund von Repression nahezu fehlt. Demnach beruht die beobachtete Morphologie der inokulierten *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen in Abbildung 3.3 auf einem Wachstumsprozeß, bei dem SKOR möglicherweise dauerhaft reprimiert war. Die SKOR-k.o.-Mutante ist von vornherein nicht in der Lage, einen funktionellen SKOR-Kanal zu exprimieren. Daher ähnelten sich auch die resultierenden Phänotypen beider Pflanzen.

Zusammengefaßt ergibt sich für die assoziative Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Azospirillum brasilense* ein Modell, bei dem durch bakteriell produzierte Phytoeffektoren pflanzliche Prozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer sichtbaren Förderung des Pflanzenwachstums führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, daß mit AUX1 und SKOR zwei Transportsysteme auf molekularer Ebene identifiziert wurden, deren Expression direkt durch die Assoziation beeinflusst wird.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die morphologischen Veränderungen, die Azospirillen im Zuge einer Assoziation bei den kolonisierten Pflanzen verursachen, nicht auf einen einzelnen Faktor zurückzuführen sind. Mit Hilfe von 1-NAA läßt sich zwar in Abhängigkeit von der Dosis ein Großteil der Wurzelmorphologieveränderungen erreichen, doch ist zumindest für ein gleichwertiges Sproßwachstum auch die Verabreichung von Gibberellinsäure notwendig. Es ist daher zu vermuten, daß eine von den Azospirillen ausgeschiedene Kombination von Phytoeffektoren für die Stimulierung des Wachstums verantwortlich ist. Abschließend feststellen läßt sich dies jedoch erst, wenn es gelingen sollte, einen *Azospirillum*-Stamm zu erzeugen, der nur einen der Phytoeffektoren bzw. überhaupt keinen ausscheidet. Wäre Auxin allein für die Ausprägung der Wurzelmorphologie entscheidend, dürfte ein Stamm, der kein Auxin produzieren kann, auch keinen wachstumsfördernden Effekt mehr ausüben. Andererseits wäre ein Stamm, der keine Gibberellinsäure produziert, nicht mehr in der Lage das Sproßwachstum zu beeinflussen. Entsprechende Synthese-Mutanten für die genannten Phytoeffektoren würden daher einen wertvollen Beitrag leisten, die Natur der assoziativen Interaktion aufzuklären. Auf der anderen Seite bieten sich weitere Experimente für pflanzliche Reinkulturen an, um den durch die Azospirillen verursachten Wachstumsschub nachzuahmen. So ließe sich auf morphologischer Ebene z. B. die Auswirkung von ko-applizierten Phytoeffektoren in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen untersuchen. Auf molekularer Ebene könnte die Expression der untersuchten K^+ -Kanäle in Gegenwart von Gibberellinsäure untersucht werden.

Eine Zunahme der K^+ -Ionenaufnahmekapazität in Gegenwart der Bakterien konnte zumindest auf Transkriptionsebene noch nicht gefunden werden. Rigas *et al.* (2001) haben mit TRH1 einen weiteren K^+ -Aufnahmekanal aus den Wurzelhaaren von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Möglicherweise ergeben sich dadurch, sowie durch die Identifizierung weiterer Kanäle, potentielle Kandidaten für K^+ -Aufnahmesysteme, deren Expression im Rahmen einer Assoziation hochreguliert werden könnte.

5 Literatur

Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Hedrich, R. 2000. GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. FEBS Lett. 24348: 1-6.

Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J., Gaber, R.F. 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS 89: 3736-3740.

Ausubel, F.M. 1984. Regulation of nitrogen fixation genes. Cell 37: 5-6.

Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29 (5-6): 911-922.

Barak, R., Nur, I., Okon, Y., Henis, Y. 1982. Aerotactic response of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 152 (2): 643-649.

Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 51-66.

Bashan, Y., Ream, Y., Levanony, H., Sade, A. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Bot. 67: 1317-1324.

Bashan, Y. und Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.

Bashan, Y. und Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. Can. J. Microbiol. 44: 168-174.

Bashan, Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. Biol. Fertil. Soils 29 (3): 246-256.

Bashan, Y., Moreno, M., Troyo, E. 2000. Growth promotion of the seawater-irrigated oilseed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. Biol. Fertil. Soils 32: 265-272.

Bashan, Y. und Vazquez, P. 2000. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. Biol. Fertil. Soils 30: 450-459.

- Bashan, Y.** und **de-Bashan, L.E.** 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2637-2643.
- Basset, M., Conejero, G., Lepetit, M., Fourcroy, P., Sentenac, H.** 1995. Organization and expression of the gene coding for the potassium transport system AKT1 of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 29: 947-958.
- Bastarrachea, F., Zamudio, M., Rivas, R.** 1988. Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol. 34: 24-29.
- Becker, D., Dreyer, I., Hoth, S., Reid, J. D., Busch, H., Lehnen, M., Palme, K., Hedrich, R.** 1996. Changes in voltage activation, Cs⁺ sensitivity, and ion permeability in H5 mutants of the plant K⁺ channel KAT1. PNAS 93: 8123-8128.
- Becker, D.** und **Hedrich, R.** 2002. Channelling auxin action: modulation of ion transport by indole-3-acetic acid. Plant Mol. Biol. 49: 349-356.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C., Guckert, A.** 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. Soil Biol. Biochem. 30 (10): 1481-1484.
- Bennett, M., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B., Feldman, K.A.** 1996. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. Science 273: 948-950.
- Boddey, R.M.** und **Döbereiner, J.** 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. Plant Soil 108: 53-65.
- Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P., George, T.** 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. Plant Soil 141: 1-11.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P.** 1989. Identification of Gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Bouché, N.** und **Bouchez, D.** 2001. *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. Cur. Opin. Plant Biol. 4: 111-117.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S., Perret, X.** 2000. Keys to symbiotic harmony. J. Bacteriol. 182 (20): 5641-5652.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Hampel, M., Okon, Y.** 1998. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. Microbiol. 144: 1989-1999.

- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Okon, Y.** 1999. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 145: 1145-1152.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Diaz, M.E., Serrano, A.M. G., Okon, Y.** 2000. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* 189 (2): 259-264.
- Burdman, S., Okon, Y., Jurkevitch, E.** 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* 26 (2): 91-110.
- Cao, Y., Glass, A.D.M., Crawford, N.M.** 1993. Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux1*, *axr1*, and *axr2*. *Plant Physiol.* 102: 983-989.
- Cao, Y., Ward, J.M., Kelly, W.B., Ichida, A.M., Gaber, R.F., Anderson, J.A., Uozumi, N., Schroeder, J.I., Crawford, N.M.** 1995. Multiple genes, tissue-specificity, and expression-dependent modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 109: 1093-1106.
- Carreno-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., Baca, B.E.** 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 264 (4): 521-530.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M.** 2001. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13: 843-852.
- Cassán, F., Bottini, R., Schneider, G., Piccoli, P.** 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol.* 125: 2053-2058.
- Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y.** 1998. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Cur. Microbiol.* 36: 241-244.
- Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y.** 2000. Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Eco.* 33 (1): 1-9.
- Cavalcante, V.A. und Döbereiner, J.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Chrispeels, M.J., Crawford, N.M., Schroeder, J.I.** 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-675.

- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J.** 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243: 463-472.
- Costacurta, A. und Vanderleyden, J.** 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21 (1): 1-18.
- Cowling, R.J. und Harberd, N.P.** 1999. Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *J. Exp. Bot.* 50: 1351-1357.
- Crawford, N.M. und Glass, A.D.M.** 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 3 (10): 389-395.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Müller-Röber, B.** 1997. New structure and function in plant K⁺ channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca²⁺ dependency. *EMBO J.* 16 (10): 2565-2575.
- Czempinski, K., Gaedeke, N., Zimmermann, S., Müller-Röber, B.** 1999. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *J. Exp. Bot.* 50: 955-966.
- Czempinski, K., Frachisse, J.M., Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Müller-Röber, B.** 2002. Vacuolar membrane localization of the *Arabidopsis* 'two-pore' K⁺ channel KCO1. *Plant J.* 29: 809-820.
- Daniel-Vedele, F., Filleur, S., Caboche, M.** 1998. Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Cur. Opinion Plant Biol.* 1: 235-239.
- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H., Chérel, I.** 1997. Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.* 16: 3455-3463.
- Davies, R.T., Goetz, D.H., Lasswell, J., Anderson, M.N., Bartel, B.** 1999. *IAR3* encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 365-376.
- De Billy, F., Grosjean, C., May, S., Bennett, M., Cullimore, J.V.** 2001. Expression studies on *AUX1*-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *MPMI* 14 (3): 267-277.
- De Boer, A.H.** 1999. Potassium translocation into the root xylem. *Plant Biol.* 1: 36-45.
- Deaker, R. und Kennedy, I.R.** 2001. Improved potential for nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7-S associated with wheat *nifH* expression as a function of oxygen pressure. *Acta. Biotech.* 21: 3-17.

- Deeken, R., Sanders, D., Ache, P., Hedrich, R.** 2000. Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K⁺ channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23 (2): 285-290.
- Dennison, K.L., Robertson, W.R., Lewis, B.D., Hirsch, R.E., Sussman, M.R., Spalding, E.P.** 2001. Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1012-1019.
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., Marco, Y.** 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS* 99 : 2404-2409.
- Dixon, R.A.** 1984. The genetic complexity of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2745-2755.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., Vanderleyden, J.** 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212: 155-164.
- Dolan, L.** 1998. Pointing roots in the right direction: the role of auxin transport in response to gravity. *Genes Develop.* 12: 2091-2095.
- Döbereiner, J.** 1980. NFb-Medium. In: *Methods for evaluating biological fixation*. Bergersen, F.J. (Hrsg.), Jon Wiley & Sons, Chichester, 545.
- Döbereiner, J.** 1983. Ten years *Azospirillum*. In: *Azospirillum II*. Klingmüller, W. (Hrsg.), Birkhäuser Verlag Basel, 9-20.
- Dubrovsky, J.G., Puente, M.E., Bashan, Y.** 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp 245 on root hair growth. *Soil Biol. Biochem.* 26 (12): 1657-1664.
- Dubrovsky, J.G., Doerner, P.W., Colón-Carmona, A., Rost, T.L.** 2000. Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1648-1657.
- Eady, R.R. und Postgate, J.R.** 1974. Nitrogenase. *Nature* 249: 805-810.
- Eady, R.R.** 1992. The dinitrogen-fixing bacteria. In: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Hrsg.), Springer-Verlag, 534-553.
- Eckardt, N.A.** 2001. New insights into auxin biosynthesis. *Plant Cell* 13: 1-3.
- Eckardt, N.A.** 2001. *Arabidopsis* genome conference 2000: How a small weed changed the world. *Plant Cell* 13: 5-10.

- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A.** 2001. *Azospirillum doebereineræ* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄ grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 17-26.
- El-Khawas, H. und Adachi, K.** 1999. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. Biol. Fertil. Soils 28: 377-381.
- Estelle, M.** 1998. Polar auxin transport: new support for an old model. Plant Cell 10: 1775-1778.
- Feng, L. und Kennedy, I.R.** 1997. Biodegradation and plant protection from the herbicide 2,4-D by plant-microbial associations in cotton production systems. Biotech. Bioeng. 54 (6): 513-519.
- Fischer, S., Rivarola, V., Mori, G.** 2000. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress. Plant Soil 225: 187-191.
- Friml, J. und Palme, K.** 2002. Polar auxin transport - old questions and new concepts? Plant Mol. Biol. 49: 273-284.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.B., Sentenac, H.** 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. Cell 94: 647-655.
- Gehring, C.A., Irving, H.R., Parish, R.W.** 1990. Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. PNAS 87: 9645-9649.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B., Hedrich, R.** 2002. Outer pore residues control the H⁺ and K⁺ sensitivity of the *Arabidopsis* potassium channel AKT3. Plant Cell 14: 1859-1868.
- German, M.A., Burdman, S., Okon, Y., Kigel, J.** 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. Biol. Fertil. Soils 32 (3): 259-264.
- Gilroy, S. und Jones, D.L.** 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. Trends Plant Sci. 5 (2): 56-60.
- Glick, B.R.** 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
- Goldsmith, M.H.M.** 1993. Cellular signaling: New insights into the action of the plant growth hormone auxin. PNAS 90: 11442-11445.

- Gonzalez, L.E.** und **Bashan, Y.** 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4): 1527-1531.
- Gray, W.M.** und **Estelle, M.** 1998. Biochemical genetics of plant growth. *Cur. Opinion Biotech.* 9: 196-201.
- Gussin, G.N., Ronson, C.W., Ausubel, F.M.** 1986. Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann. Rev. Genet.* 20: 567-591.
- Hadas, R.** und **Okon, Y.** 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils* 5: 241-247.
- Halbleib, C.M.** und **Ludden, P.W.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130 (5): 1081-1084.
- Hansen, H.** und **Grossmann, K.** 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.* 124: 1437-1448.
- Hartmann, A., Singh, M., Klingmüller, W.** 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
- Hartmann, A., Fu, H., Burris, R.H.** 1986. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 165: 864-870.
- Hartmann, A.** und **Burris, R.H.** 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 169: 944-948.
- Hartmann, A., Fu, H., Burris, R.H.** 1988. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 87-93.
- Hedden, P.** 1999. Recent advances in gibberellin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50: 553-563.
- Hedrich, R.** und **Dietrich, P.** 1996. Plant K⁺ channels: Similarity and diversity. *Bot. Acta* 109: 1-8.
- Hedrich, R., Hoth, S., Becker, D., Dreyer, I., Dietrich, P.** 1998. On the structure and function of plant K⁺ channels. In: *Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development*. Lo Schiavo, F., Last, R. L., Morelli, G., Raikhel, N. V. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 35-45.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P., Sussman, M.R.** 1998. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* 280 (5365): 918-921.

- Holguin, G., Patten, C.L., Glick, B.R.** 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fertil. Soils* 29 (1): 10-23.
- Holguin, G., Vazquez, P., Bashan, Y.** 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils* 33: 265-278.
- Howard, J.B. und Rees, D.C.** 1996. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev.* 96: 2965-2982.
- Höflich, G., Wiehe, W., Kühn, G.** 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50: 897-905.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H., Hedrich, R.** 2001. K⁺ channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett.* 508: 463-469.
- Janzen, R., Rood, S., Dormar, J., McGill, W.** 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1061-1064.
- Kennedy, I.R. und Tchan, Y.T.** 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. *Plant Soil* 141: 93-118.
- Kepinski, S. und Leyser, O.** 2002. Ubiquitination and auxin signaling: a degrading story. *Plant Cell* 14: 81-95.
- Kerk, N.M., Jiang, K., Feldman, L.J.** 2000. Auxin metabolism in the root apical meristem. *Plant Physiol.* 122: 925-932.
- Ketchum, K.A. und Slayman, C.W.** 1996. Isolation of an ion channel gene from *Arabidopsis thaliana* using the H5 signature sequence from voltage-dependent K⁺ channels. *FEBS Lett.* 378: 19-26.
- Kim, E.J., Kwak, J.M., Uozumi, N., Schroeder, J.I.** 1998. AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10: 51-62.
- Koyama, H., Toda, T., Kojima, H., Hara, T.** 1995. Direct observation of root-elongation of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in hydroponic culture. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41 (1): 173-176.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., Thibaud, J.B.** 2000. pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett.* 466: 351-354.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J.** 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8 (7): 298 -300.

- Lin, W., Okon, Y., Hardy, R.W.F.** 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 45 (6): 1775-1779.
- Logan, H., Basset, M., Véry, A.A., Sentenac, H.** 1997. Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. Physiol. Plant. 100: 1-15.
- Lynch, J.M.** 1986. Rhizosphere microbiology and its manipulation. Biol. Agricult. Horticult. 3: 143-152.
- Maathuis, F.J.M. und Sanders, D.** 1995. Contrasting roles in ion transport of two K⁺-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. Planta 197 : 456-464.
- Maathuis, F.J.M. und Sanders, D.** 1999. Plasma membrane transport in context - making sense out of complexity. Cur. Opinion Plant Biol. 2 (3): 236-243.
- Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Gradmann, D.** 1997. Kinetics of high-affinity K⁺ uptake in plants, derived from K⁺- induced changes in current-voltage relationships. Planta 203: 229-236.
- Malamy, J.E. und Ryan, K. S.** 2001. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 127: 899-909.
- Manulis, S., Haviv-Chesner, A., Brandl, M.T., Lindow, S.E., Barash, I.** 1998. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. gypsophilae. MPMI 11 (7): 634-642.
- Marchal, K. und Vanderleyden, J.** 2000. The "oxygen paradox" of dinitrogen-fixing bacteria. Biol. Fertil. Soils 30: 363-373.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J.** 1999. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. EMBO J. 18: 2066-2073.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M., Sandberg, G.** 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. Plant Cell 14: 589-597.
- Marschener, H.** 1998. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. Field Crops Res. 56: 203-207.
- Marschener, H., Römheld, V., Horst, W.J., Martin, P.** 1986. Root-induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk. 149: 441-456.

- Marten, I., Hoth, S., Deeken, R., Ache, P., Ketchum, K.A., Hoshi, T., Hedrich, R.** 1999. AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. PNAS 96: 7581-7586.
- Martin-Didonet, C.C.G., Chubatsu, L.S., Souza, E.M., Kleina, M., Rego, F.G.M., Rigo, L.U., Yates, M.G., Pedrosa, F. O.** 2000. Genome structure of the genus *Azospirillum*. J. Bacteriol. 182 (14): 4113-4116.
- Martinez Noël, G.M.A., Madrid, E.A., Bottini, R., Lamattina, L.** 2001. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits pathogen growth in vitro. Plant Physiol. Biochem. 39: 815-823.
- Mascarua-Esparza, M.A., Villa-Gonzalez, R., Caballero-Mellado, J.** 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. Plant Soil 106: 91-95.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A, Guerinot, M.L.** 2001. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 126: 1646-1667.
- Masucci, J.D. und Schiefelbein, J.W.** 1996. Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. Plant Cell 8: 1505-1517.
- Matthysse, A.G., Stretton, S., Dandie, C., McClure, N.C., Goodman, A.E.** 1996. Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 145 (1): 87-94.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koorneef, M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282: 662-682.
- Michiels, K. und Vanderleyden, J., Van Gool, A.** 1989. *Azospirillum* - plant root associations: a review. Biol. Fertil. Soils 8: 356-368.
- Miller, K.J. und Wood, J.M.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 50: 101-136.
- Mugnai, M., Bazzicalupo, M., Fani, R., Gallori, E., Paffetti, D., Pastorelli, R.** 1994. Factors affecting nitrogen fixation and *nif* gene transcription in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 120: 133-136.
- Müller, A.** 1997. Genetische und molekulare Analyse des AtPIN2-Gens aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Köln.

- Müller, A., Hillebrand, H., Weiler, E. W.** 1998. Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 206: 362-369.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, P., Palme, K.** 1998. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-6911.
- Murashige, T. und Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Newman, E.I.** 1985. The rhizosphere: carbon sources and microbial populations. In: *Ecological Interactions in Soil: Plants, Microbes and Animals*. Fitter, A.H. (Hrsg.), Blackwell Scientific Publications, 107-119.
- Normanly, J. und Bartel, B.** 1999. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. *Cur. Opinion Plant Biol.* 2: 207-213.
- Okon, Y.** 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotech.* 3 (9): 223-228.
- Okon, Y. und Hardy, R.W.F.** 1983. Developments in basic and applied biological nitrogen fixation. *Plant Physiology - A Treatise*, 5-54.
- Okon, Y. und Kapulnik, Y.** 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 90: 3-16.
- Oliveira, I.C., Lam, H.M., Coschigano, K., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.** 1997. Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (3): 185-198.
- Oliveira, R.G.B. und Drozdowicz, A.** 1981. Bacteriocins in the genus *Azospirillum*. *Rev. Microbiol (S. Paulo)* 12 (2): 42-47.
- Olszewski, N., Sun, T., Gubler, F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14: 61-80.
- Östin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R.P., Sandberg, G.** 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 285-296.
- Palme, K. und Gälweiler, L.** 1999. PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Cur. Opinion Plant Biol.* 2: 375-381 .
- Patten, C.L. und Glick, B.R.** 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.

- Pedrosa, F.O.** 1988. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 345-384.
- Peoples, M.B.** und **Craswell, E.T.** 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141: 13-39.
- Pereg-Gerk, L., Paquelin, A., Gounon, P., Kennedy, I. R., Elmerich, C.** 1998. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpAf Family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *MPMI* 11 (3): 177-187.
- Persello-Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C., Thibaud, M.C., Achouak, W., Robaglia, C., Nussaume, L.** 2001. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root-associated *Pseudomonas*. *Planta* 212: 190-198.
- Philippar, K., Fuchs, I., Lüthen, H., Hoth, S., Bauer, C.S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Böttger, M., Becker, D., Hedrich, R.** 1999. Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *PNAS* 96: 12186-12191.
- Piccoli, P., Lucangeli, C.D., Schneider, G., Bottini, R.** 1997. Hydrolysis of [17,17-²H₂]gibberellin A₍₂₀₎ glucoside and [17,17-²H₂]gibberellin A₍₂₀₎ glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Reg.* 23: 179-182.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K., Estelle, M.** 1990. The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* 94: 1462-1466.
- Pongs, O.** 1992. Voltage-gated K⁺ channels. In: *Aspects of transport proteins.* De Pont, J.J.H.H.M (Hrsg.), Elsevier Science Publishers, 297-313.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Onckelen, H.** 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *MPMI* 6 (5): 609-615.
- Puente, M.E., Holguin, G., Glick, B.R., Bashan, Y.** 1999. Root-surface colonization of black mangrove seedlings by *Azospirillum halopraeferens* and *Azospirillum brasilense* in seawater. *FEMS Microbiol. Eco.* 29: 283-292.
- Quispel, A.** 1991. A critical evaluation of the prospects for nitrogen fixation with non-legumes. *Plant Soil* 137: 1-11.
- Rahman, A., Ahamed, A., Amakawa, T., Goto, N., Tsurumi, S.** 2001a. Chromosaponin I specifically interacts with AUX1 protein in regulating the gravitropic response of *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 125: 990-1000.

- Rahman, A., Amakawa, T., Goto, N., Tsurumi, S.** 2001b. Auxin is a positive regulator for ethylene-mediated response in the growth of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* 42: 301-307.
- Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G.K.** 1998. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 1369-1378.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K., De Ley, J.** 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with root of Kallar grass (*Leptochloa* [L.] Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 43: 574-584.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I.** 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 162 (1): 190-195.
- Reinhold, B., Hurek, T., Niemann, E.G., Fendrik, I.** 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 520-526.
- Reintanz, B.** 1997. Funktionelle Charakterisierung der Kaliumkanal α -Untereinheit AtKC1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Köln.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., Hedrich, R.** 2002. AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel α -subunit modulates root hair K^+ influx. *PNAS* 99: 4079-4084.
- Rigas, S., Debrosses, G., Haralampidis, K., Vicente-Agullo, F., Feldmann, K.A., Grabov, A., Dolan, L., Hatzopoulos, P.** 2001. *TRH1* encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* 13: 139-151.
- Roberts, S.K.** 1998. Regulation of K^+ channels in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 116: 145-153.
- Rovira, A.D.** 1969. Plant root exudates. *Bot. Rev.* 35: 35-57.
- Rudnick, P., Meletzus, D., Green, A., He, L., Kennedy, C.** 1997. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. *Soil Biol. Biochem.* 29: 831-841.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeck, P., Scheres, B.** 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99 (5): 463-472.

- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J., Anderson, J.A., Gaber, R.F.** 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 258: 1654-1658.
- Schachtman, D.P.** 2000. Molecular insights into the structure and function of plant K⁺ transport mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 127-139.
- Schönknecht, G., Spoormaker, P., Steinmeyer, R., Brüggeman, L., Ache, P., Dutta, R., Reintanz, B., Godde, M., Hedrich, R., Palme, K.** 2002. KCO1 is a component of the slow-vacuolar (SV) ion channel. *FEBS Lett.* 511: 28-32.
- Schroth, M.N. und Hancock, J.G.** 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., Grignon, C.** 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.
- Spalding, E.P., Hirsch, R.E., Lewis, D.R., Qi, Z., Sussman, M., Lewis, B.D.** 1999. Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. *J. Gen. Physiol.* 113: 909-918.
- Stanke, R.** 2000. LeAMT1;2, a molecular target to investigate ammonium transport in tomato roots and N-supply by diazotrophic bacteria. Dissertation, Universität Hannover.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M.** 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Develop.* 15: 2648-2653.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K., Hedrich, R.** 2001. KAT1 is not essential for stomatal opening. *PNAS* 98: 2917-2921.
- Tam, Y.Y., Epstein, E., Normanly, J.** 2000. Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol.* 123: 589-595.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J.** 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Tester, M.** 1999. The control of long-distance K⁺ transport by ABA. *Trends Plant Sci.* 4 (1): 5-6.

- The Arabidopsis Genome Initiative.** 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Timmusk, S.** und **Wagner, E.G.H.** 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *MPMI* 12 (11): 951-959.
- Trewavas, A.J.** 2001. The population/biodiversity paradox. Agricultural efficiency to save wilderness. *Plant Physiol.* 125: 174-179.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** 1997. AUX/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Umali-Garcia, M., Hubbell, D.H., Gaskins, M.H., Dazzo, F.B.** 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
- Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J.I., Muto, S.** 1998. Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *PNAS* 95: 9773-9778.
- Van den Berg, C., Weisbeek, P., Scheres, B.** 1998. Cell fate and cell differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Planta* 205: 483-491.
- Van Dommelen, A., Van Bastelaere, E., Keijers, V., Vanderleyden, J.** 1997. Genetics of *Azospirillum brasilense* with respect to ammonium transport, sugar uptake, and chemotaxis. *Plant Soil* 194: 155-160.
- Vande Broek, A., Michiels, K., Van Gool, A., Vanderleyden, J.** 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *MPMI* 6: 592-600.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Vanderleyden, J.** 1998. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiol.* 144: 2599-2606.
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, J.** 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 181: 1338-1342.
- Very, A.A.** und **Sentenac, H.** 2002. Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane. *Trends Plant Sci.* 7: 168-175.

- Walch-Liu, P.** und **Engels, C.** 1998. Pflanzenartenunterschiede im Wurzelwachstum bei verschiedener N-Ernährung: N-Form-Effekt und/oder pH-Effekt? In: Pflanzenernährung, Wurzeleistung, Exsudation. Merbach, W. (Hrsg.), B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart, Leipzig, 73-79.
- Yagi, K., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M., Yamane, H.** 2001. Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* FS. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 1265-1269.
- Yegorenkova, I.V., Konnova, S.A., Sachuk, V.N., Ignatov, V.V.** 2001. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. Plant Soil 231: 275-282.
- Zakharova, E.A., Iosipenko, A.D., Ignatov, V.V.** 2000. Effect of water-soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. Microbiol. Res. 155: 209-214.
- Zhang, Y., Burris, R.H., Ludden, P.W., Roberts, G.P.** 1993. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 175: 6781-6788.
- Zhang, Y., Burris, R.H., Ludden, P.W., Roberts, G.P.** 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 152: 195-204.
- Zimmer, W., Wesche, M., Timmermans, L.** 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. Cur. Microbiol. 36: 327-331.
- Zimmermann, S.** und **Sentenac, H.** 1999. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. Cur. Opinion Plant Biol. 2 (6): 477-482.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., Müller-Röber, B.** 1999. Ion channels in plant signaling. Cell Mol. Life Sci. 55: 183-203.

6 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Hannover, im Dezember 2002

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Irene Marten und Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ anfertigen zu können.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hedrich für die Überlassung der Gensonden bedanken und für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die LightCycler-Analysen durchzuführen.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Istvan Fendrik für die Übernahme des Referats dieser Dissertation.

Ebenfalls danke ich meinen Mitstipendiaten aus dem Graduiertenkolleg sowie meinen Ko-Betreuern Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann und Herrn Prof. Dr. Karl Bauer für ihre Gesprächsbereitschaft und besonders der Arbeitsgruppe von Prof. Bauer für die Einführung ins „*phosphoimaging*“.

Ich bedanke mich bei Dr. Dirk Becker für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft, vor allem während meines Aufenthalts am Julius-von-Sachs-Institut in Würzburg.

Bei Dr. Peter Ache und Susanne Michel bedanke ich mich für ihre Geduld und Unterstützung bei den LightCycler-Analysen und bei Dr. Rosalia Deeken für die fachkundigen Antworten auf meine Fragen.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe am Institut für Mikrobiologie für die Bereitstellung des Axiophots. Für die Einweisung in die Handhabung des Gerätes bedanke ich mich vor allem bei Armgard Janczikowski.

Natürlich gilt ein ganz großer und herzlicher Dank „meiner“ immer kleiner gewordenen Arbeitsgruppe am Institut für Biophysik: Heidi und Matthias. Danke für das Korrekturlesen, Diskutieren, Trösten, Unterstützen und Lachen. Nicht vergessen sind ebenfalls die Ex-Doktoranden Tina und Kai sowie der Ex-Diplomand Matthias W.

Ein großes Dankeschön an die Biophysik! Insbesondere: Melanie, für das Korrekturlesen; Ingrid, für die Hilfe im S1-Labor und die vielen schönen Gespräche; Andrea, für die Hilfe bei Vertragsformalitäten; Ralf, für die Farbausdrucke und der Werkstatt, für alles wo praktische Hilfe gebraucht wurde.

Mein tiefer persönlicher Dank geht an meine Familie: meine Eltern und Schwiegereltern und Rüdiger, dafür daß Ihr in der ganzen Zeit dieser Arbeit zu mir gestanden und nicht aufgehört habt, mich zu lieben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sandra Schulze-Stanke, geb. Schulze
 Geburtsdatum: 18. Dezember 1968
 Geburtsort: Hannover
 Familienstand: verheiratet
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1981 bis 1989 Helene-Lange-Schule, Gymnasium, Hannover
 Mai 1989 Abitur an der Helene-Lange-Schule

Beruf und Studium

1989 bis Jan. 1992 Ausbildung zur Schriftsetzerin bei der Schlüterschen Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover

Feb. bis Okt. 1992 Angestellt bei der Schlüterschen Verlagsanstalt und Druckerei als Schriftsetzerin im Bereich Telefon- und Adressbücher

1992 bis 1997 Studium der Biologie an der Universität Hannover mit den Schwerpunkten Botanik, Mikrobiologie, Biophysik und Phytopathologie (Prüfungsfächer)

seit Sept. 1997 Hilfwissenschaftliche Tätigkeit und Betreuung von Praktika am Institut für Mikrobiologie (bis Dez. 2000) und am Institut für Biophysik, Hannover

1997 bis Juli 1998 Diplomarbeit mit dem Thema:
 „Wachstumsphysiologische Untersuchungen am diazotrophen Endophyten *Acetobacter diazotrophicus*“
 betreut von Herr Prof. Dr. I. Fendrik
 am Institut für Biophysik, Hannover.

seit Dez. 1998 Anfertigung der Dissertation:
 „Molekulare Grundlagen der Pflanze-Mikroorganismus-Interaktion am Beispiel der Assoziation mit *Azospirillum brasilense*“
 betreut von Frau PD Dr. I. Marten
 am Institut für Biophysik, Hannover.