

Arbeitspaket A2.2: Phyllosphäre

Der Einfluss von erhöhtem CO₂ und steigender Oberflächentemperatur auf die Phyllosphäre in einem Dauergrünland

Ebru L. Aydogan¹, Olga Budich¹, Katharina Brühl¹, Martin Hardt², Anne Jansen-Willems^{3,4}, Gerald Moser⁴, Christoph Müller^{4,5}, Peter Kämpfer¹, Stefanie P. Glaeser¹

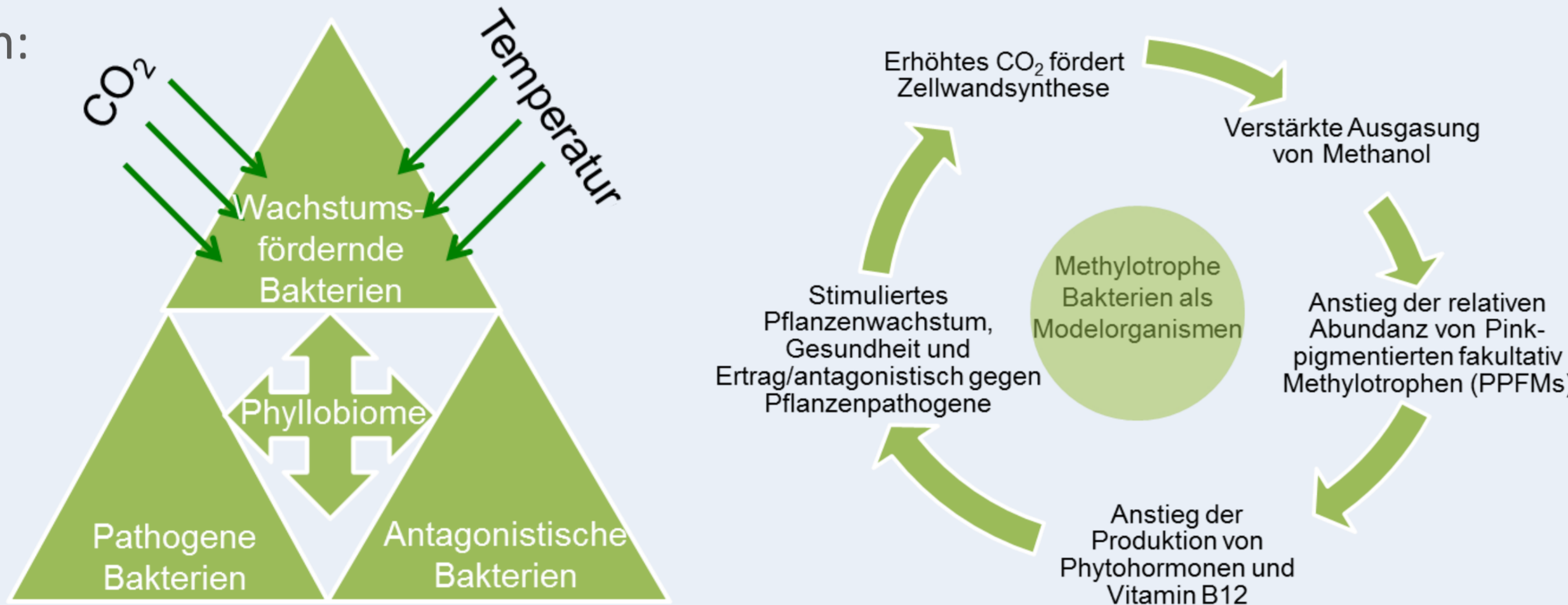
¹ Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
² Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg-Imaging Unit, Justus-Liebig-Universität Giessen
³ Teagasc Johnstown Castle, Wexford, Ireland
⁴ Institut für Pflanzenökologie, Justus-Liebig-Universität Giessen
⁵ School of Biology and Environmental Science, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

Einleitung / Hintergrund

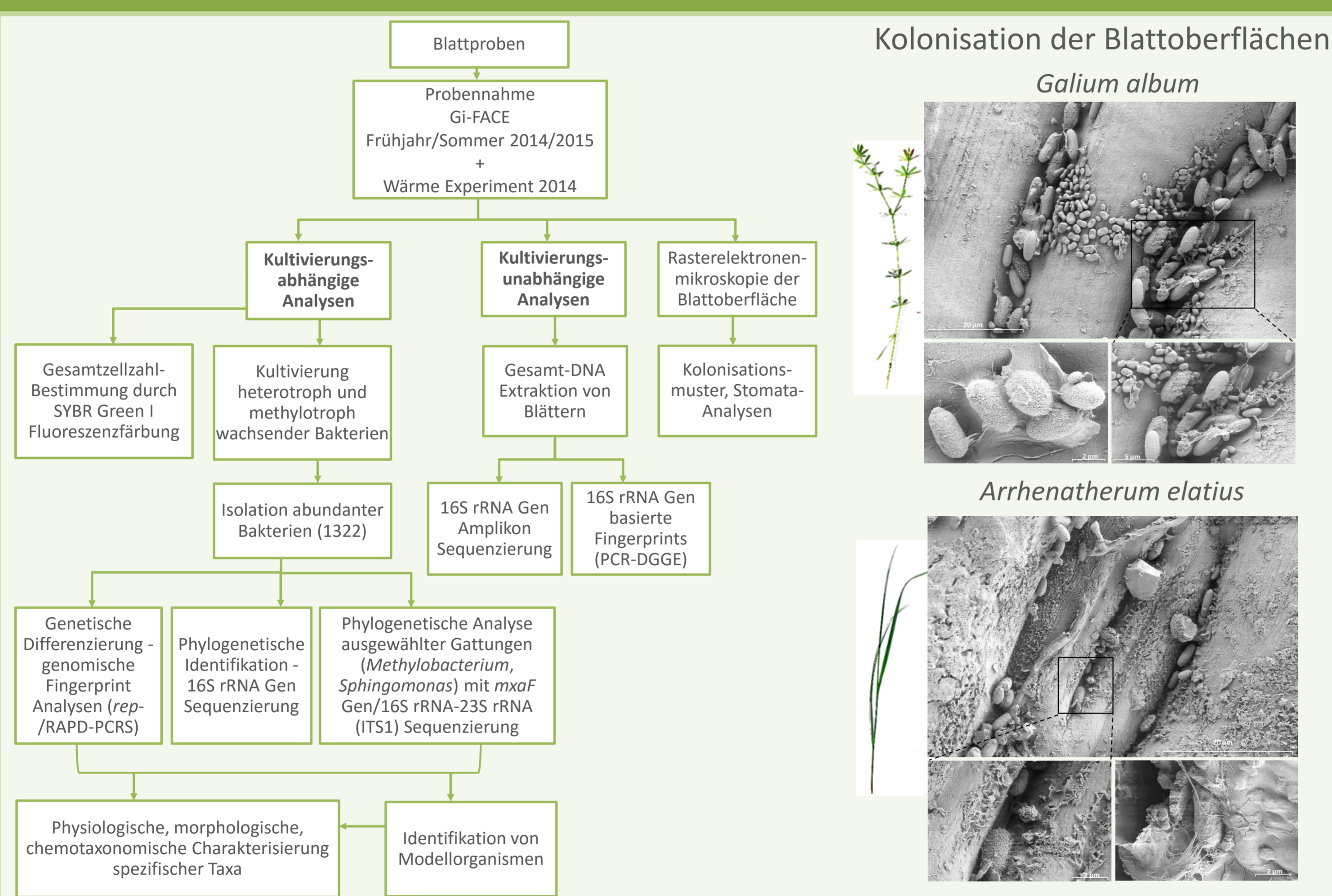
Der oberirdische Teil von Pflanzen ist hauptsächlich von Bakterien kolonisiert [1]. Epiphytische (auf der Pflanzenoberfläche angesiedelte) und endophytische (im Pflanzengewebe angesiedelte) Bakterien (im Folgenden zusammengefasst als Phyllobiome) haben Einfluss auf das Wachstum und die Gesundheit von Pflanzen. Die Zusammensetzung des Phyllobioms hängt stark von der Pflanzenart und von verschiedenen Umweltfaktoren ab. Die Veränderung von abiotischen Umweltfaktoren kann zu strukturellen und funktionellen Verschiebungen des Phyllobioms führen.

Bedeutende pflanzenwachstumsfördernde Bakterien sind pink pigmentierte fakultativ methylo troph e Bakterien (PPFMs) der Gattung *Methylobacterium* [2]. Wichtige heterotroph wachsende antagonistische Bakterien sind *Spingomonas* spp., welche die Pflanze vor pathogenen Invasionen schützen.

Hypothesen:



Material & Methoden



Quantitative Analyse – Konzentration kultivierbarer Bakterien

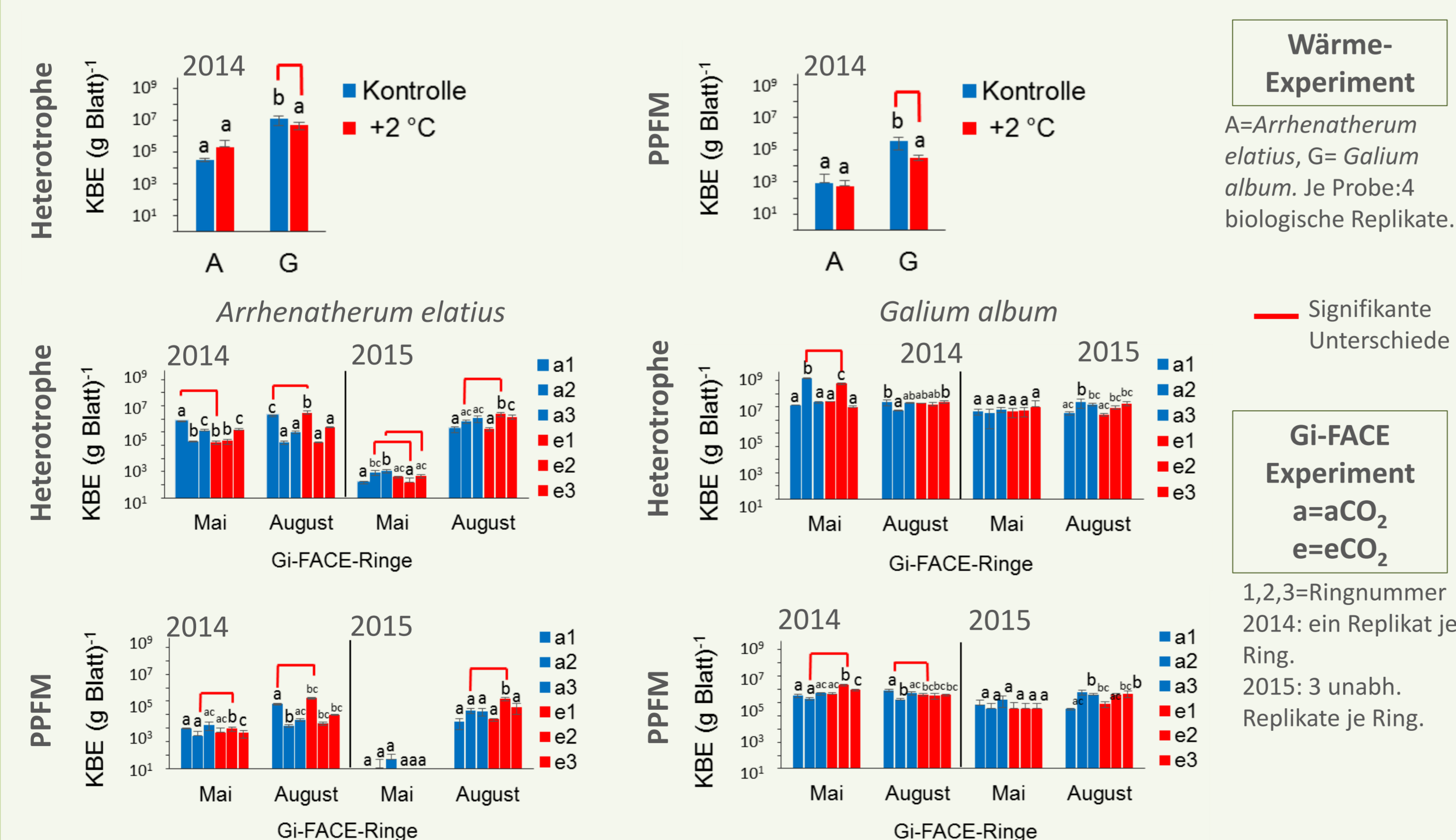
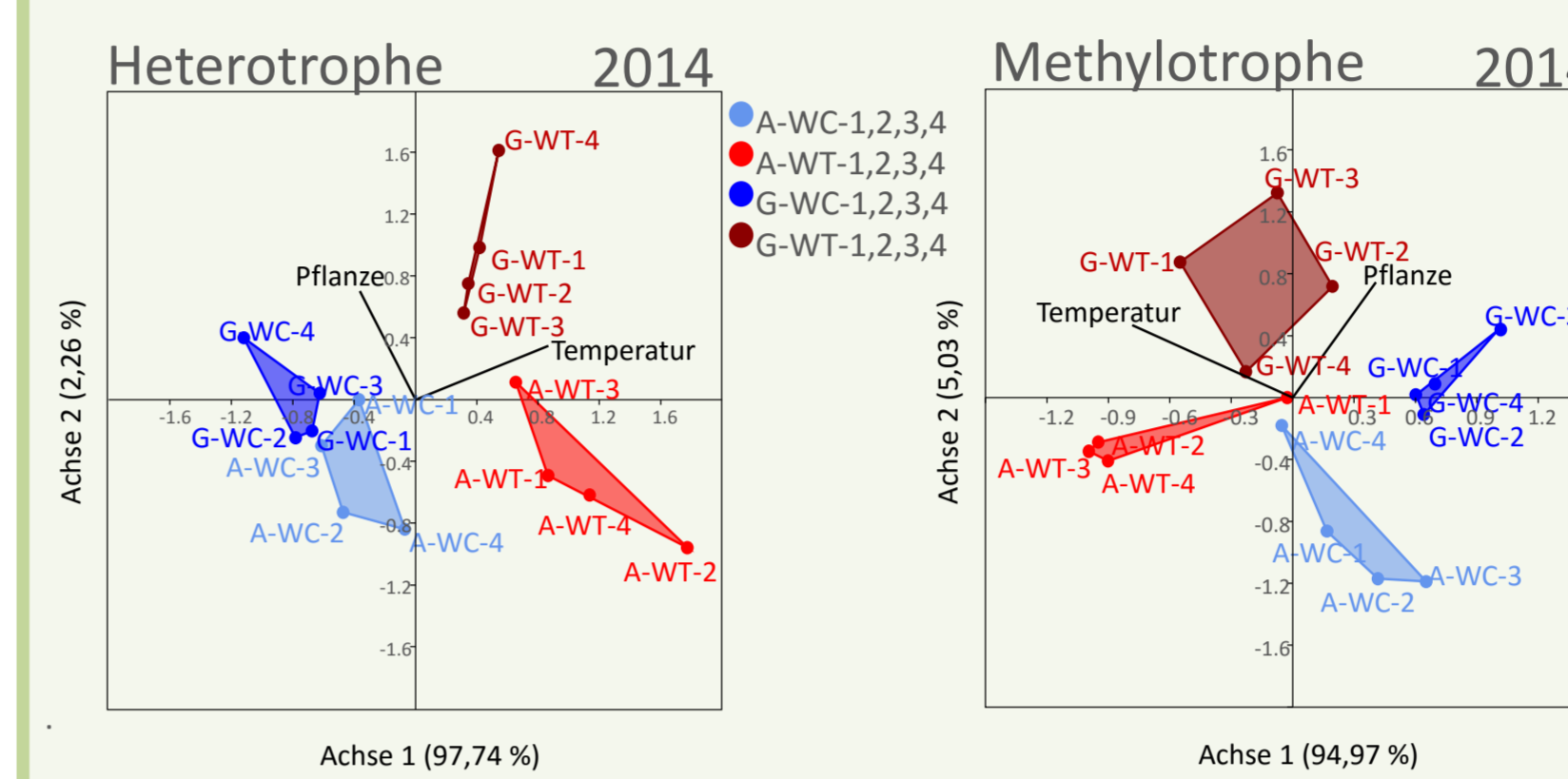


Abb. 1 Konzentration kultivierbarer Bakterien gegeben als koloniebildende Einheiten (KBE) pro g Blatt. Signifikanztest: One Way ANOVA in SigmaPLOT (Applied Maths). Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede. Heterotroph: Kultivierung auf 1/2 R2A, aerob, 25 °C; methylo troph: Kultivierung auf M125, Methanol als einzige C-Quelle, aerob, 25 °C.

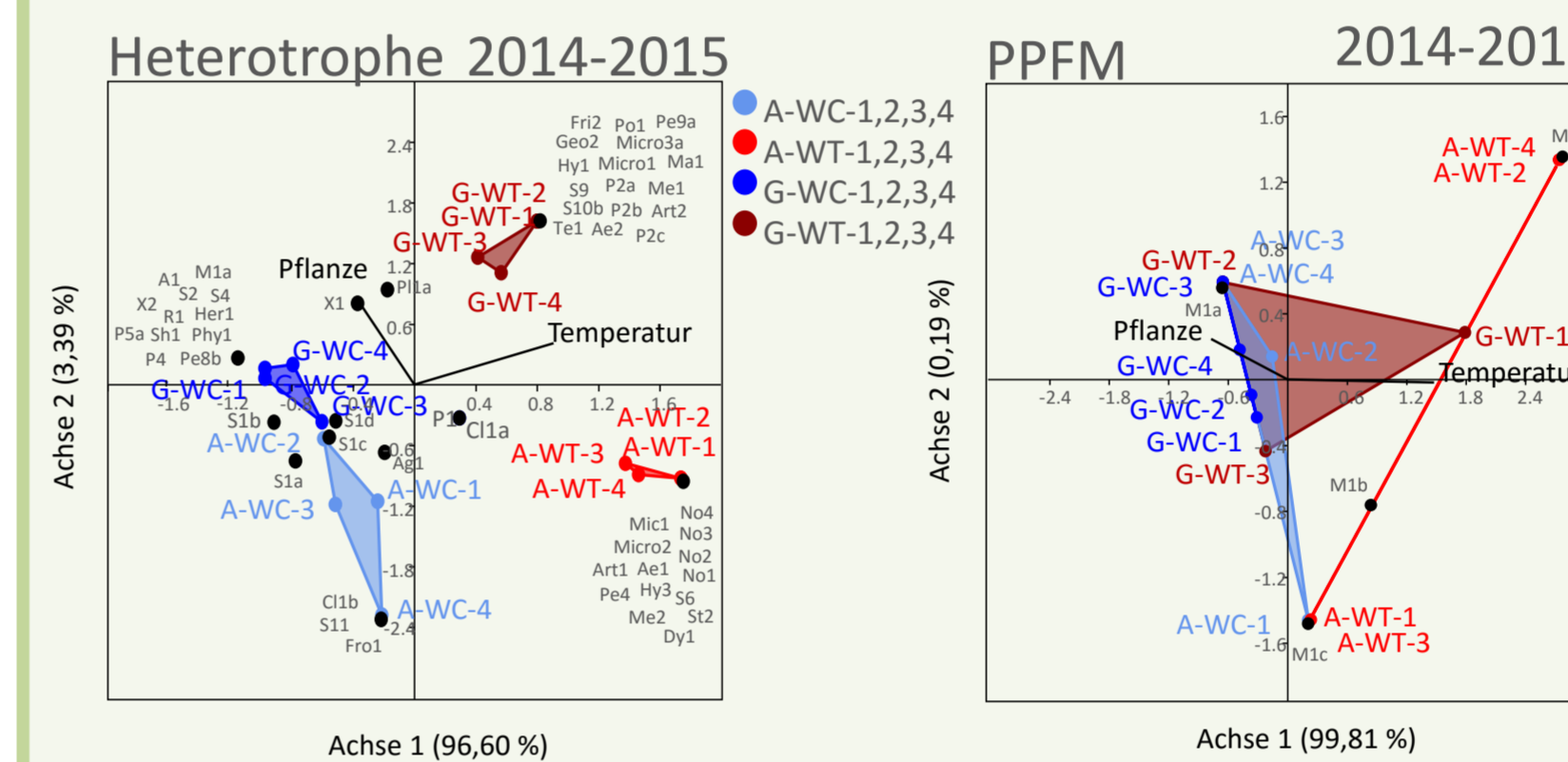
Bisherige Ergebnisse

Qualitative Analyse – Diversität kultivierbarer abundanter Bakterien

Wärme-Experiment

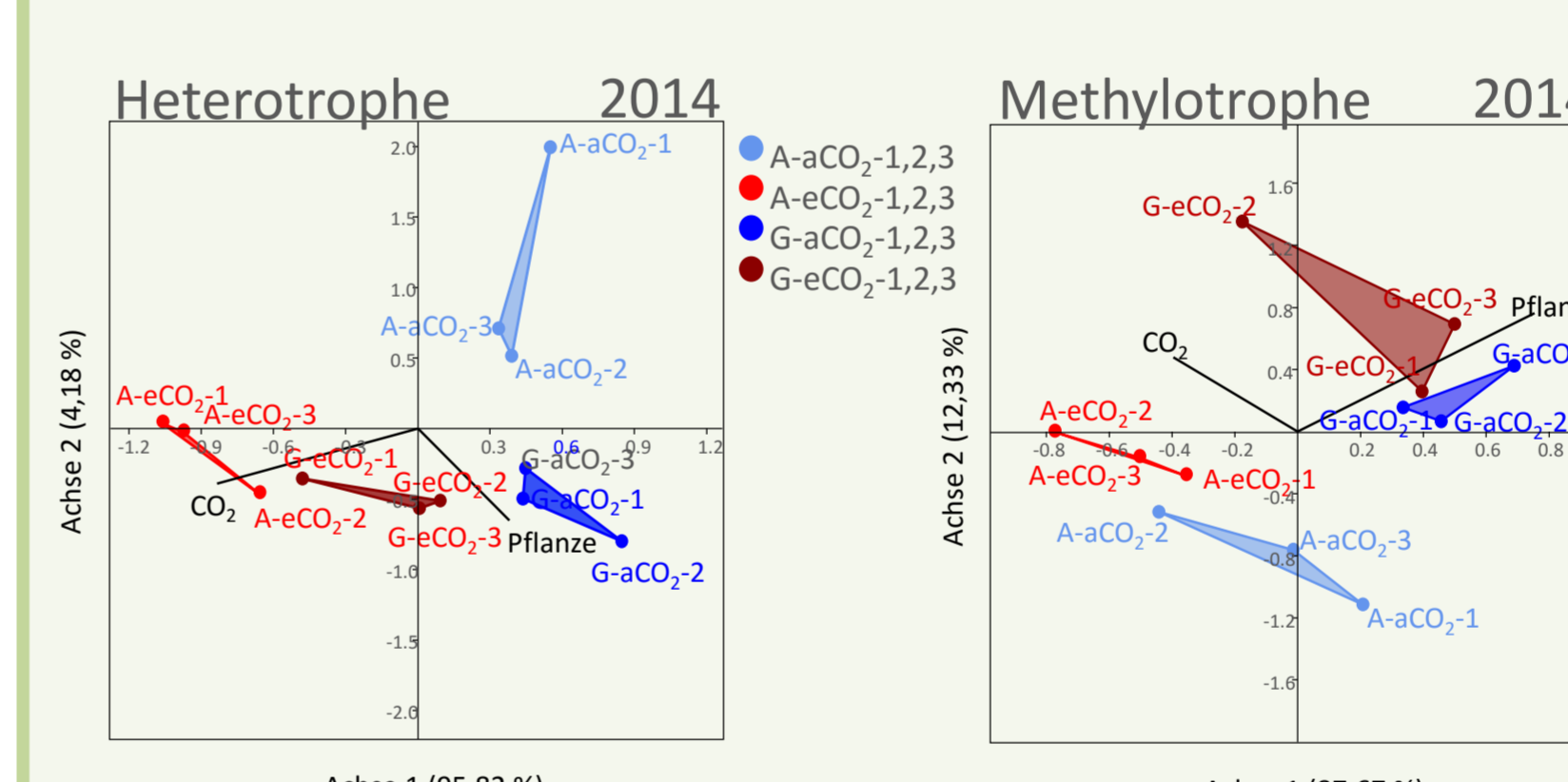


CCA-Analyse von PCR-DGGE Fingerprintmuster, die mit universellen 16S rRNA Gen bindenden Primern generiert wurden. Verwendete Zellsätze repräsentieren Bakterien, die nach Kultivierung auf den höchsten Verdünnungsstufen der Agarplatten gewachsen waren. 1, 2, 3, 4: Biologische Replikate.

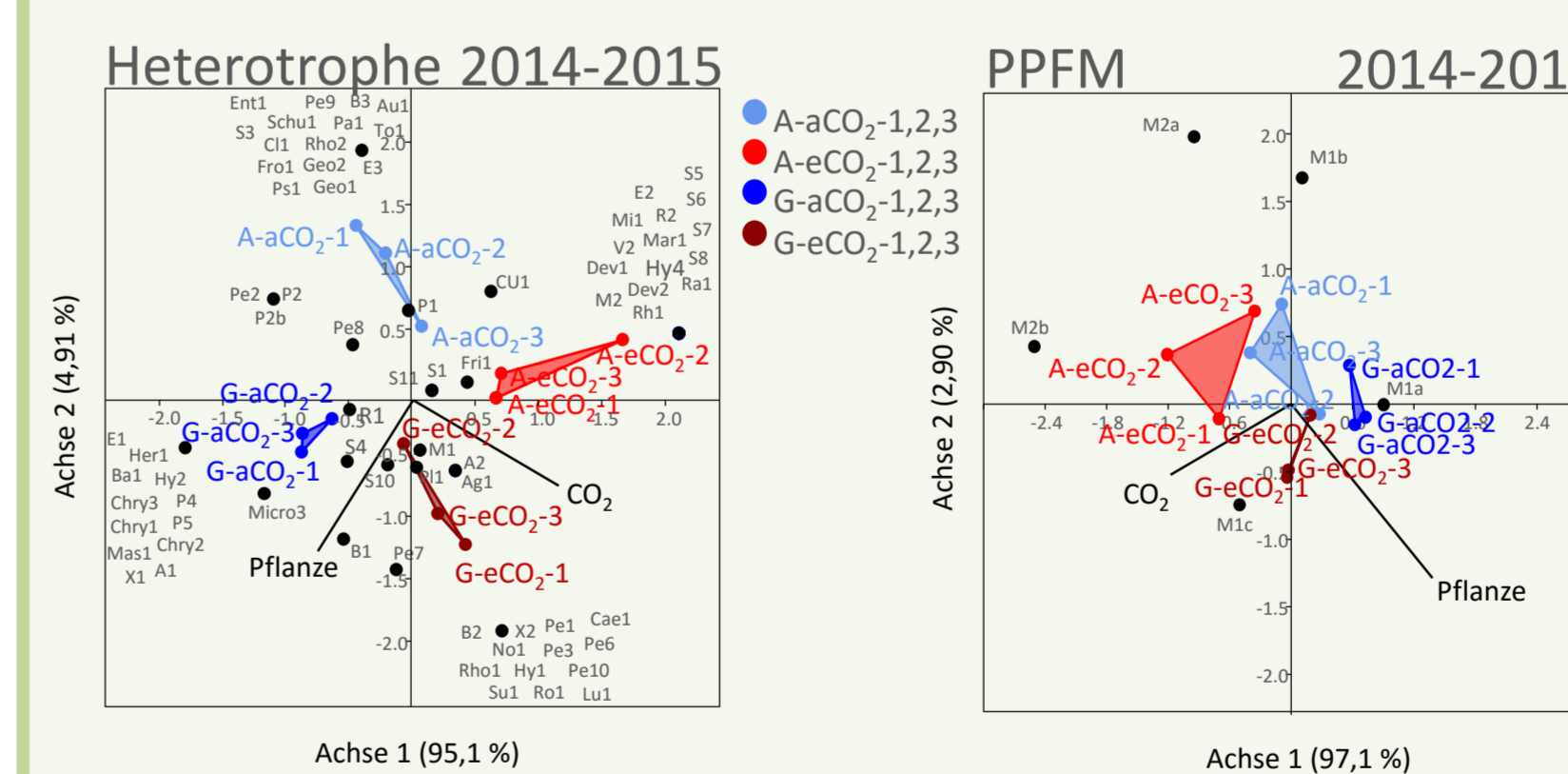


CCA-Analyse der kultivierten abundanter Bakterien (Einteilung in Phylotypen) - Identifiziert über partielle 16S rRNA Gen Sequenzierung). Verwendete Zellsätze repräsentieren Bakterien, die nach Kultivierung von den höchsten Verdünnungsstufen der Agarplatten isoliert wurden. 1, 2, 3, 4: Biologische Replikate.

Gi-FACE



CCA-Analyse von PCR-DGGE Fingerprintmuster, die mit universellen 16S rRNA Gen bindenden Primern generiert wurden. Verwendete Zellsätze repräsentieren Bakterien, die nach Kultivierung auf den höchsten Verdünnungsstufen der Agarplatten gewachsen waren. 1, 2, 3: Gi-FACE Ringe.



CCA-Analyse der kultivierten abundanter Bakterien (Einteilung in Phylotypen) - Identifiziert über partielle 16S rRNA Gen Sequenzierung). Verwendete Zellsätze repräsentieren Bakterien, die nach Kultivierung von den höchsten Verdünnungsstufen der Agarplatten isoliert wurden. 1, 2, 3: Gi-FACE Ringe.

Abb. 2 Korrelationsanalyse basierend auf der Diversität abundanter kultivierter heterotropher und methylo troph er Bakterien. Canonical correspondence Analyse (CCA) wurde in PAST (3.11) durchgeführt. A= Arrhenatherum elatius, G= Galium album, WC=Umgebungstemperatur, WT= erhöhte Oberflächentemperatur.

Phylotypen-Tabelle Wärme-Experiment: (n=125 Isolate)

Gattung	Phylotyp	Arrhenatherum elatius	Galium album
Gammaproteobacteria	Pseudomonas	a1 a2 a3 a4 a11 a12 a13 a14	a1 a2 a3 a4 a11 a12 a13 a14
	Xylophilus	K2	
	Methylobacterium	P1a	
	Microvirga	Mic1	
Betaproteobacteria	Rhodospirillum	Rh1	
	Aureimonas	A1	
	Shinella	Sh1	
	Mesorhizobium	Me1	
Alphaproteobacteria	Spingomonas	S1a	
		S1b	
		S1c	
		S1d	
Bacteroidetes	Spingobacterium	Sp1	
	Pedobacter	Pe1b	
	Dyadobacter	Dy1	
	Hymenobacter	Hy1	
Actinobacteria	Microbacterium	Mic1	
		Mic2	
		Mic3	
		Mic4	
Alphaproteobacteria	Agria	Ag1	
	Herbiconium	Her1	
	Frondhabians	Fr1	
	Martensimicrobia	Ma1	

Phylotypen berechnet durch 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeiten. Isolate mit 99-100% Sequenzähnlichkeit wurden als gleicher Phylotyp definiert. a1-a4: 4 biologische Replikate unter Umgebungsbedingungen, t1-t4: 4 biologische Replikate unter erhöhter Oberflächentemperatur (+ 2 °C)

Phylotypen-Tabelle Gi-FACE Experiment: (n= 278 Isolate)

Gattung	Phylotyp	Arrhenatherum elatius	Galium album
Gammaproteobacteria	Erwinia	E1	
	Leptotheca	Le1	
	Rahnella	R1	
	Pseudomonas	P1a	
Betaproteobacteria	Xylophilus	X1	
	Microvirga	Mic1	
	Caeromonas	Ca1	
	Rhodospirillum	Rh1	
Gammaproteobacteria	Leptotheca	Le1	
	Methylobacterium	M1b	
		M1c	
		M1d	
Alphaproteobacteria	Brevundimonas	B1	
		B2	
		B3	
		B4	
Actinobacteria	Devosia	Dev1	
	Rhodobium	Rh1	
	Aureimonas	A1	
		A2	
Actinobacteria	Microbacterium	Mic1	
		Mic2	
		Mic3	
		Mic4	
Actinobacteria	Planctobacter	Pl1a	
	Caeromonas	Ca1	
	Schumannella	Sch1	
	Agria	Ag1	
Actinobacteria	Herbiconium	Her1	
	Frondhabians	Fr1	
	Clavibacter	Cl1	
	Rathayibacter	Ra1	
Actinobacteria	Phycodactylophilus	Ph1	
	Mitomonas	Mi1	
	Enterococcus	En1	
		En2	
Actinobacteria	Marmoricola	Ma1	
	Nocardioles	No1	
	Parabacter	Pa1	
	Rhodococcus	Rh1	
Alphaproteobacteria	Phylotyp	a1 a2 a3 a4 a11 a12 a13 a14	a1 a2 a3 a4 a11 a12 a13 a14
	Methylobacterium	M1a	
		M1b	
		M1c	

Phylotypen berechnet durch 16S rRNA Gen Sequenzähnlichkeiten. Isolate mit 99-100% Sequenzähnlichkeit wurden als gleicher Phylotyp definiert. a1-a3: aCO₂ Ringe; e1-e3: eCO₂ Ringe

Ausblick Auslaufphase

- Gesamt-DNA Extraktion von Blattproben und 16S rRNA Gen-Amplikon basierte Illumina MiSeq Sequenzierung („Phyllobiome-Analyse“).
- Analyse der Genome von bakterieller Isolate die adaptierte Phylotypen und/oder Genotypen repräsentieren.
- Pflanzenversuche mit Modellorganismen vor allem aus den Gattungen *Spingomonas* und *Methylobacterium*.