

Mikrobielle Vielfalt in der Rhizosphäre und im Boden

Microbial diversity in rhizosphere and bulk soil

Kornelia Smalla* & Holger Heuer

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig

*Korrespondierender Autor, kornelia.smalla@jki.bund.de, +49(0)531 2993814

DOI: 10.5073/jka.2012.436.018

Zusammenfassung

Bodenmikroorganismen sind von enormer Bedeutung für funktionierende Stoffkreisläufe und die Pflanzengesundheit. Die Entwicklung und Anwendung von Nukleinsäure-basierten Untersuchungstechniken hat ein neues Verständnis der Vielfalt von Mikroorganismen in der Rhizosphäre und im Boden ermöglicht. Mit Hilfe dieser kultivierungsunabhängigen Methoden konnte gezeigt werden, dass die mikrobielle Diversität durch eine Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst wird. Basierend auf der Sequenzanalyse von 16S rRNA-Genen und ITS-Fragmenten, die aus Boden-DNA amplifiziert wurden, wurde die taxonomische Zuordnung (Gattungen, Arten) der Mikroorganismen ermöglicht, deren Abundanz durch die Pflanzenart oder -sorte, den Standort oder Änderungen in der landwirtschaftlichen Praxis beeinflusst wird. Die Diversifizierung innerhalb einer Art und die Anpassung von Bakterienpopulationen an sich ändernde Umweltbedingungen erfolgen häufig durch mobile genetische Elemente. Pathogenitätsdeterminanten, Gene für die Interaktion mit der Wirtspflanze oder Antibiotika- und Schwermetallresistenzgene sind häufig auf Plasmiden lokalisiert. Dieser Artikel fasst die Forschungsarbeiten zur mikrobiellen Diversität im Boden an der BBA und im JKI in Braunschweig zusammen.

Stichwörter: Mikrobielle Diversität, Bakterien, Pilze, DNA-Extraktion, Kultivierbarkeit, genetische Flexibilität, Gentransfer, mobile genetische Elemente

Summary

Soil microbes are of enormous importance for functioning nutrient cycles as well as for plant health. The development and application of nucleic acid based techniques provided new insights into the diversity of bulk and rhizosphere soil microbes. The microbial diversity in soils was shown by means of cultivation-independent methods to be influenced by various biotic and abiotic factors. Sequence based analysis of 16S rRNA genes and ITS fragments amplified from total DNA extracted directly from soil allows to determine the taxonomic affiliation (phylum, class, order, genera and species) of those taxa influenced in their relative abundance by the plant species or genotype, the site, or changes in agricultural management. The diversification within a species and the adaptation of bacterial populations to changing environmental conditions is often fostered by mobile genetic elements. Pathogenicity determinants, genes responsible for the bacterial interaction with its host plant or antibiotic and heavy metal resistance genes are often localized on plasmids. This review summarizes research on microbial diversity performed over more than twenty years at the BBA and now in the JKI in Braunschweig.

Keywords: Microbial diversity, bacteria, fungi, DNA extraction, culturability, genetic flexibility, gene transfer, mobile genetic elements

Einleitung

Die enorme Diversität von Mikroorganismen im Boden ist durch die Heterogenität dieses Lebensraums bestimmt. In unmittelbarer räumlicher Nähe können die Lebensbedingungen durch Gradienten abiotischer (O_2 , pH, Wasserverfügbarkeit, Porengrößen bestimmt durch die mineralische Zusammensetzung) und biotischer Faktoren (mikrobieller Austausch organischer Nährstoffe, Wurzelexsudate) sehr unterschiedlich sein. Mikronischen mit anaeroben, mikro-aerophilen und aeroben Bedingungen existieren innerhalb weniger Millimeter einer Bodenprobe, so dass in einem Gramm Boden sehr viele (geschätzt: 5.000-50.000) unterschiedliche Bakterienarten vorkommen (GANS

et al., 2005). Die Zahl von Bakterienzellen pro Gramm Boden wird basierend auf der Bestimmung der 16S rRNA-Genkopien auf 10^{10} - 10^{11} geschätzt. Als Rhizosphäre wird der Boden bezeichnet, der durch die Exsudate von Pflanzen beeinflusst wird (BERG und SMALLA, 2009). Mikroorganismen im Boden sind von Bedeutung für funktionierende Stoffkreisläufe, aber auch für das Pflanzenwachstum und die Pflanzengesundheit. Die Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt im Boden und in der Rhizosphäre und wie diese auf sich ändernde Umweltfaktoren wie z.B. die landwirtschaftliche Praxis reagiert, war bis Mitte der 90-er Jahre sehr schwierig, da nur ein geringer Anteil der Bakterien mit Hilfe von traditionellen Kultivierungsverfahren isoliert und dann als Reinkultur untersucht werden konnte. Ursachen für den geringen Erfolg, Bodenbakterien zu isolieren, sind in der Nutzung ungeeigneter Kultivierungsverfahren zu sehen (zu hohe Nährstoffkonzentrationen, nicht optimale O_2 -, CO_2 - oder pH-Bedingungen, zu kurze Kultivierungszeiten).

Aber auch Bakterien, die normalerweise durch traditionelle Kultivierungsbedingungen untersucht werden können, wie z. B. der Erreger der Schleimkrankheit bei Kartoffeln, *Ralstonia solanacearum*, oder verschiedene Humanpathogene können durch Umweltstress (z. B. Temperaturen unter $10^\circ C$) die Fähigkeit verlieren, Kolonien zu bilden. Die Limitierungen der traditionellen kultivierungsabhängigen Analyse von Bakterien können durch die Nutzung Nukleinsäure-basierter Untersuchungsmethoden überwunden werden. Auch die Taxonomie der Mikroorganismen hat sich durch Sequenzierung phylogenetischer Markergene (16S rRNA: Bakterien, Archaea; 18S rRNA oder ITS: Pilze, Oomyceten) in den letzten 25 Jahren grundlegend geändert. Dabei werden noch nicht gültig beschriebene Bakterienarten oft auch als „operational taxonomic unit“ (OTU) bezeichnet und definiert durch eine 16S rRNA-Genidentität über 97 %. Für Isolate wird als weiteres Kriterium eine DNA-DNA-Ähnlichkeit von über 70 % herangezogen. Mit der Entwicklung und Nutzung Nukleinsäure-basierter Nachweismethoden begann Anfang der 90-er Jahre ein neues Zeitalter in der Untersuchung der Vielfalt pflanzen- und bodenassoziierter Mikroorganismen. In diesem Beitrag stellen wir insbesondere die am JKI in diesem Zusammenhang durchgeführten Arbeiten kurz dar.

Extraktion von Nukleinsäuren

Die kultivierungsunabhängige Analyse basiert zumeist auf der Untersuchung von DNA oder RNA, die direkt aus Boden- und Pflanzenproben extrahiert wird. Auch wenn verschiedene Böden unterschiedliche Anforderungen an notwendige Reinigungsschritte stellen, gilt die Extraktion von Nukleinsäuren als für die Routine geeignet und kann auch für große Probenzahlen angewendet werden (SMALLA et al., 1993; VAN ELSAS et al., 2000; SMALLA und van ELSAS, 2010; DING et al., 2011). Nach einem harschen Zellaufschluss mit Hilfe einer Kugelmühle (z. B. der FastPrep-Maschine) kann die DNA oder RNA direkt aus der Bodenmatrix oder aus Pflanzenproben isoliert werden. Allerdings müssen ko-extrahierte Huminsäuren gründlich entfernt werden, bevor die Untersuchung mit molekularen Methoden wie z. B. der Polymerasekettenreaktion (PCR) möglich ist. Bei problematischen Böden (z. B. mit Schwermetallen kontaminiert) oder bei Rhizosphärenproben wird häufig zunächst das Mikroorganismenpellet extrahiert. Diese Methode wird auch als indirekte Nukleinsäureextraktion bezeichnet. Zumeist werden mit dieser Methode geringere DNA/RNA-Mengen extrahiert, dafür enthält die Nukleinsäure-Lösung geringere Kontaminationen mit ko-extrahierten, die PCR inhibierenden Stoffen. Direkt extrahierte DNA aus Bodenproben enthält nicht nur die Erbsubstanz von Mikroorganismen, sondern auch der Mesofauna oder von Pflanzen. Durch den harschen Zellaufschluss ist auch die DNA von Sporen oder Dauerformen repräsentiert. Die Ausbeute und Fragmentierung der DNA kann nach Agarosegelelektrophorese analysiert werden, aber erst die Quantifizierung der 16S rRNA-Kopienzahlen erlaubt eine Abschätzung der Bakterienzahl. Dabei muss beachtet werden, dass die Zahl der 16S rRNA-Gene pro Zelle zwischen 1-15 bei verschiedenen Spezies variiert. Direkt extrahierte RNA ermöglicht die Analyse der metabolisch aktiven Fraktion oder auch der Genexpression (GOMES et al., 2004, 2005).

Analyse der strukturellen Diversität im Boden: welche Arten und wie häufig?

Um zu untersuchen, welche Bakterien- oder Pilzarten in einem Boden oder in der Rhizosphäre vorhanden sind, werden meist Genfragmente der 16S rRNA bzw. der ITS aus der direkt extrahierten DNA mit Hilfe von Primern, die an konservierte Regionen binden, amplifiziert. Zwischen den konservierten Regionen liegen variable Sequenzabschnitte, die eine phylogenetische Zuordnung der amplifizierten 16S rRNA-Gensequenzen nach Sequenzierung durch Vergleiche mit Sequenzen in der Genbank ermöglichen. Zu Beginn der 90-er Jahre wurden PCR-Produkte durch Klonierung und Sequenzierung analysiert. Diese Methode war zeit- und kostenaufwändig und konnte daher nur für geringe Probenzahlen genutzt werden. Erst durch die Entwicklung molekularer Fingerprinting-Techniken wurde es möglich, größere Probenzahlen vergleichend zu analysieren. Die Auftrennung von PCR-Produkten gleicher Größe basiert auf den Sequenzunterschieden. Die in den 90-er Jahren etablierten Fingerprint-Methoden erlaubten erstmals die vergleichende Analyse verschiedener Proben (NÜBEL *et al.*, 1996; HEUER *et al.*, 1997; MUYSER und SMALLA, 1998; SMALLA *et al.*, 2007). In den an der BBA bzw. dem JKI durchgeführten Forschungsprojekten wurden 16S rRNA-Genfragmente mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) basierend auf sequenzabhängigen Unterschieden im Schmelzverhalten der doppelsträngigen DNA aufgetrennt. Die Ähnlichkeit der DGGE-Fingerprints innerhalb einer Behandlung und zwischen Behandlungen (zwischen Böden, zwischen nicht-durchwurzeltem Boden und Rhizosphäre oder Rhizosphären von verschiedenen Pflanzenarten) konnte verglichen werden und Banden, die nur bei bestimmten Behandlungen auftraten, durch Klonierung und Sequenzierung charakterisiert werden (SMALLA *et al.*, 2001; HEUER *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2001, 2003; MILLING *et al.*, 2004; KROPF *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006A,B, 2007; OROS-SICHLER *et al.*, 2006; WEINERT *et al.*, 2009). Wird das 16S rRNA-Genprodukt mit bakterienspezifischen Primern erzeugt, stellt der DGGE-Fingerprint ein Display der am häufigsten vorkommenden Bakterienpopulationen dar, und die Bandenintensität gibt einen Hinweis auf die relative Abundanz. Um auch seltenere Bakterienpopulationen zu erfassen, wurde die Strategie der Nutzung gruppenspezifischer Primer verfolgt. So können Fingerprints der *Actinobacteria* (HEUER *et al.*, 1997), *Alphaproteobacteria* (HEUER und SMALLA, 1999), *Betaproteobacteria* (GOMES *et al.*, 2001), *Pseudomonadaceae* (MILLING *et al.*, 2004), *Enterobacteriaceae* (BINH *et al.*, 2010) oder Streptomyceten (WEINERT *et al.*, 2009) erfasst werden. Dadurch kann die Empfindlichkeit der Detektion deutlich verbessert werden. Da zumeist nur ein Bruchteil der aus einem Gramm extrahierten DNA für die PCR eingesetzt wird, werden Mikroorganismen, die in Zellzahlen unter 100 pro Gramm im Boden vorkommen, wahrscheinlich nicht erfasst. Die größte Diversität von Mikroorganismen befindet sich aber in der sogenannten „rare biosphere“. Molekulare Fingerprints wurden im Rahmen von DFG-, EU- und BMBF-geförderten Projekten an der BBA bzw. im JKI genutzt, um den Einfluss des Standorts (Boden, Klima, Fruchtfolge etc.), der Pflanzenart und der Sorte auf die Zusammensetzung der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften in der Rhizosphäre zu untersuchen. In verschiedenen Projekten konnte gezeigt werden, dass der Boden häufig den stärksten Effekt auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hat (HEUER *et al.*, 2002; WEINERT *et al.*, 2009). Die Zusammensetzung bakterieller und pilzlicher Gemeinschaften in der Rhizosphäre unterscheidet sich oft dadurch, dass die relative Abundanz einiger Populationen in der Rhizosphäre erhöht ist. Saisonale Veränderungen in der relativen Abundanz von Bakterien und Pilzpopulationen sowie die pflanzenartabhängige Diversität in der Rhizosphäre konnten mit Hilfe von DGGE-Analysen gezeigt werden (SMALLA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003). In einigen Fällen sind die Wurzelexsudate von Pflanzen für eine spezifische Anreicherung von Bakterienpopulationen verantwortlich. So scheinen die Wurzelexsudate von *Rosaceae* eine ausgeprägte Anreicherung z.B. von Actinobakterien oder Pseudomonaden zu verursachen (COSTA *et al.*, 2006A-C, 2007), was im Hinblick auf die Bodenmüdigkeit von Bedeutung sein könnte. Molekulare Fingerprints wurden auch zur Untersuchung von Effekten gentechnisch veränderter Pflanzen auf die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass für die untersuchten gentechnisch veränderten Kartoffeln die Effekte im Rahmen der normalen Sortenvariabilität lagen (HEUER *et al.*, 2002; MILLING *et al.*, 2004; WEINERT *et al.*, 2009). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gary Anderson wurden PhyloChips genutzt, um die Diversität von Bakterien in der Rhizosphäre von

drei Kartoffelsorten, die an zwei Standorten in Bayern angebaut wurden, zu analysieren. Mehr als 2.400 OTU, die zu 12 Phyla gehörten, konnten detektiert werden. Die statistische Analyse zeigte, dass sich die Fluoreszenz von 692 OTU signifikant zwischen den Standorten unterschied, während 207 OTU sich signifikant zwischen den Sorten unterschieden. Interessanterweise gehörten viele der sortenspezifischen OTU zu den *Pseudomonadales*, *Actinomycetales* und *Enterobacteriales*. Dieses Ergebnis ist interessant, weil bakterielle Antagonisten, aber auch Pathogene, sehr häufig zu diesen Familien gehören. Für die gleichen Rhizosphärenproben wurde pro Sorte und Standort eine Klonbibliothek analysiert. Beide Techniken zeigten, dass die meisten OTU zu den *Alpha*- und *Betaproteobacteria* sowie den *Acidobacteria* gehörten. Acidobakterien werden bei traditionellen Kultivierungsverfahren gewöhnlich nicht beobachtet, da es oft mehrere Wochen dauert, bis sie Kolonien auf festen Nährmedien bilden. Obwohl aus den sechs Klonbibliotheken nur eine begrenzte Zahl von Klonen sequenziert wurde (insgesamt 311), konnten wir zeigen, dass in den Rhizosphärenproben der drei Kartoffelsorten ‚Désirée‘, ‚Baltica‘ und ‚Sibu‘, die an den Standorten Roggenstein und Oberviehhausen in Bayern angebaut wurden, Alpha- und Betaproteobakterien gefolgt von den Acidobakterien am häufigsten vorkamen. OTU, die zu den *Acidobacteriaceae*, *Planctomycetaceae*, *Verrucomicrobiales* oder der TM7-Gruppe gehören, wurden an fast allen Sorten nachgewiesen, d.h., sie gehörten zu den dominanten Rhizobakterien. Die Rolle dieser teilweise durch keinerlei Isolate repräsentierten Bakterien ist noch völlig unklar. Mit Hilfe von DGGE-Fingerprints konnten DEMATHEIS *et al.*, (2012) zeigen, dass sich in Folge des Fressverhaltens von Diabrotica-Larven die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre von Mais änderte und Populationen wie *Acinetobacter calcoaceticus* in der Rhizosphäre möglicherweise durch erhöhte phenolische Substanzen angereichert wurden. Molekulare Fingerprinting-Methoden sind gut geeignet, Effekte der Inokulation von Biokontrollstämmen (GÖTZ *et al.*, 2006; ADESINA *et al.*, 2009; XUE *et al.*, 2012; GROSCHE *et al.*, 2012) oder die Effekte von Kontaminationen wie durch Veterinärantibiotika (KOPMANN *et al.*, 2012 Revision), polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAK; GOMES *et al.*, 2005) oder durch Pestizide (DEALTRY *et al.*, in Vorbereitung) zu untersuchen. Während DGGE-Fingerprints geeignet sind, die Variabilität in der relativen Abundanz von Bakterien- und Pilzpopulationen zu detektieren, werden Informationen über die taxonomische Zuordnung erst nach der Sequenzierung von Banden re-amplifizierter PCR-Produkte möglich. Daher wird zunehmend die direkte Sequenzierung von PCR-Amplikons mit Hilfe der Pyrosequenzierung quasi als Fingerprinting-Technik genutzt. Werden 16S rRNA Gen-PCR-Produkte von Wiederholungen der gleichen Behandlung sequenziert, dann wird nicht nur die Inventarisierung der vorhandenen OTU und ihrer relativen Abundanz möglich, sondern auch die Ermittlung signifikant erhöhter OTU und die Cluster-Analyse, wie sie üblicherweise bei der DGGE angewendet wird. Erfreulich ist die Übereinstimmung der Ergebnisse der 16S rRNA Amplikon-Analyse mit der DGGE und der Pyrosequenzierung. Die Zahl der Sequenzen, die pro Wiederholung erhalten wird, liegt zwischen 5.000 und 10.000, und deren bioinformatische Analyse ist derzeit eine große Herausforderung (DING *et al.*, 2011).

Herausforderung der Verknüpfung der strukturellen und funktionellen Diversität

Differenzierende Banden können durch Sequenzierung identifiziert werden. Oft geben diese sogenannten „responder“ auch Hinweise auf Änderungen in der Abundanz von Populationen mit bestimmten funktionellen Genen (GOMES *et al.*, 2005). Mit PCR-Systemen für Gene, die für Enzyme kodieren, die am ersten Schritt des aeroben Abbaus von PAK beteiligt sind, konnten wir zeigen, dass in landwirtschaftlichen Böden diese Gene zunächst nicht detektierbar waren und nach einer Inkubation, z. B. mit Naphthalin oder Phenanthren, in künstlich kontaminierten Böden die entsprechenden Abbaugene angereichert wurden (GOMES *et al.*, 2005; DING *et al.*, 2010). Die Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten dieser funktionellen Gene zeigt, dass deren Häufigkeit und Diversität abhängig vom Bodentyp war (DING *et al.*, 2010). In Kooperation mit J. Zhou, Universität Oklahoma, und D. Pieper, HZI Braunschweig, wurden auch die Möglichkeiten und Limitierungen sogenannter „functional gene arrays“ ausgelotet, die eine parallele Detektion vieler funktioneller Gene ermöglichen (GOMES *et al.*, 2010; Ding *et al.*, im Druck). In Abb.1 ist das

experimentelle Herangehen zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität von Bodenmikroorganismen dargestellt.

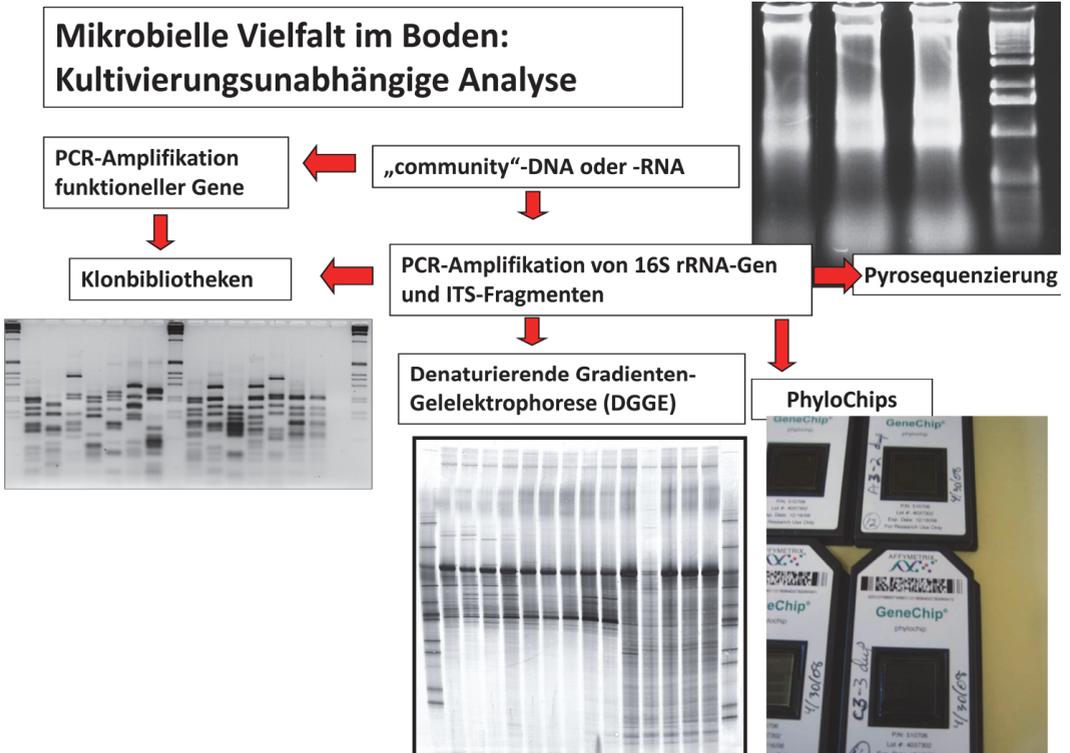


Abb. 1 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung der strukturellen und funktionellen Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften im Boden

Fig. 1 Experimental approaches for studying the structural and functional diversity of microbial communities in soil

Bedeutung mobiler genetischer Elemente für die bakterielle Vielfalt von Bakterien

Der evolutionäre Erfolg von Bakterien wird wesentlich durch die hohe Plastizität bakterieller Genome bestimmt. Erkenntnisse basierend auf der zunehmenden Zahl vollständig sequenzierter Genome bestätigen das von CARNIEL und HACKER (2001) vorgeschlagene Konzept, dass Bakterien einer Art das sogenannte Core-Genom teilen, sich aber häufig im sogenannten flexiblen Genpool deutlich unterscheiden (s. Abb. 2). Der flexible Genpool trägt wesentlich zur innerartlichen Vielfalt von Bakterien bei. Mobile genetische Elemente wie Plasmide, Phagen, Transposons, Integrons, oder Pathogenitäts- bzw. genomische Inseln tragen häufig Gene und Gencluster, die wesentlich für die Anpassung von Bakterienpopulationen an sich ändernde Umweltbedingungen bzw. Umweltstress (Schwermetalle, Antibiotika, Pestizide) sind. Gene, die für die Interaktion mit Pflanzen bedeutsam sind, sind ebenfalls häufig auf Plasmiden lokalisiert, wie z. B. bei Pflanzenpathogenen wie *Pseudomonas syringae* oder *Agrobacterium tumefaciens* (HEUER *et al.*, 2008; HEUER und SMALLA, 2012). Insbesondere der Beitrag von Plasmiden bei der Anpassung von Bodenbakterien an Selektionsdruck durch Antibiotika, Schwermetalle und Pestizide wurde am JKI mit Hilfe von kultivierungsunabhängigen Methoden im Rahmen von DFG-, EU- und INTAS-Projekten untersucht. Die vollständige Sequenz verschiedener Plasmide konnte in Zusammenarbeit mit Eva Top (University of Idaho, Moscow, Idaho) ermittelt werden. Basierend auf den Sequenzinformationen können

Primersysteme entwickelt werden, die eine PCR-basierte Detektion dieser Plasmide in direkt extrahierter DNA ermöglichen. Mit Hilfe der real-time PCR ist eine Quantifizierung des Vorkommens von Plasmiden, aber auch von Resistenz- und Abbaugenen in Gesamt-DNA in Abhängigkeit von Kontamination und Bioverfügbarkeit möglich. Mit diesen Methoden konnten wir zeigen, dass das Vorhandensein von Antibiotika in Schweinegülle, die zur Düngung von Böden verwendet wird, zu einer erhöhten Abundanz von Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen führt. Aber auch sogenannte Biofilter, die zur Biodegradation von Pestiziden verwendet werden, führen zu einer Anreicherung mobiler genetischer Elemente, die zur Anpassung der Bakterien an sich ändernde Bedingungen beitragen.

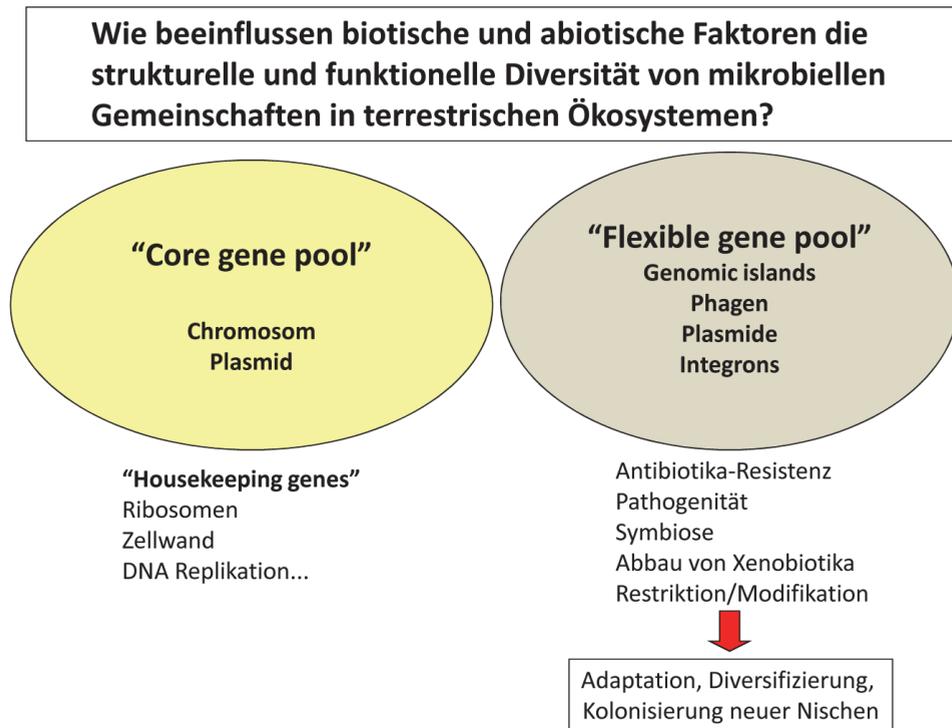


Abb. 2 Die Sequenzierung von bakteriellen Genomen zeigte: Bakterien einer Art haben das gleiche Core-Genom, unterscheiden sich aber häufig im sogenannten flexiblen Genpool.

Fig. 2 *Sequencing of bacterial genomes revealed: bacteria affiliated to the same species share the genes of the core gene pool but often differ in the genes of the flexible gene pool.*

Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse von aus Boden und Pflanzenproben direkt extrahierten Nucleinsäuren hat zu einem neuen Verständnis der mikrobiologischen Vielfalt und deren Dynamik und Plastizität in Bezug auf ihre Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen geführt. Die Detektion und Quantifizierung von pathogenspezifischen Sequenzen erlaubt den kultivierungsunabhängigen Nachweis von Pflanzenpathogenen und ermöglicht damit auch neue Einblicke in deren Ökologie. Die molekularen Fingerprinting-Methoden sind ebenfalls geeignet, Effekte von biologischen Kontrollstämmen und Pestiziden auf die strukturelle Diversität mikrobieller Gemeinschaften nachzuweisen und sollten zukünftig die bislang angewendeten „black box“-Methoden ergänzen. Diese Methoden können auch angewendet werden, um Effekte landwirtschaftlicher Praxis auf mikrobielle Gemeinschaften -

insbesondere im Hinblick auf Suppressivität gegenüber Phytopathogenen - zu untersuchen. Weiterhin soll mit molekularen Techniken untersucht werden, welche Bakterien und Pilze im Boden spezifisch an pflanzenparasitäre Nematoden anheften. Die Cuticula von Nematoden ist eine extrazelluläre Matrix, die eine Schutzfunktion vor der Adhäsion schädlicher Mikroorganismen im Boden hat. Der Nutzen einer dennoch stattfindenden Anheftung für die Mikroben soll untersucht werden (Transport zur Wurzelzone, Ko-Infektion der Wurzel, Infektion des Nematoden).

Ein Schwerpunkt der Forschungsarbeiten zur mikrobiellen Vielfalt am JKI wird auch zukünftig die Untersuchung des flexiblen und insbesondere des plasmidlokalisierten Genpools bleiben, da dieser für die Anpassung von Bakterien an sich ändernde Umweltbedingungen von Bedeutung ist. Besonders spannend wird es, mit Hilfe molekularer Methoden das pflanzliche Mikrobiom und dessen Kommunikation mit der Pflanze besser zu verstehen, um diese Erkenntnisse gezielt für den Pflanzenschutz nutzen zu können.

Danksagung: Die Forschung zur biologischen Vielfalt in der Rhizosphäre wurde unterstützt durch DFG-, BMBF- und EU-Drittmittelprojekte.

Literatur

- ADESINA, M., R. GROSCH, A. LEMBKE, T. VATCHEV and K. SMALLA, 2009: *In vitro* antagonists of *Rhizoctonia solani* tested on lettuce: rhizosphere competence, biocontrol efficiency and rhizosphere microbial community response. *FEMS Microbiology Ecology* **69**, 62-74.
- BERG, G. and K. SMALLA, 2009: Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**, 1-13.
- BINH, C. T. T., H. HEUER, N. C. M. GOMES, M. KAUPENJOHANN and K. SMALLA, 2010: Similar bacterial community structure and high abundance of sulfonamide resistance genes in field-scale manures. *In* Manure: Management, Uses and Environmental Impacts. C.S. Dellaguardia, Ed., pp 141-166. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- COSTA, R., N. C. M. GOMES, R. PEIXOTO, N. RUMJANEK, G. BERG, L. MENDONÇA-HAGLER and K. SMALLA, 2006a: Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil biology and biochemistry* **38**, 2434-2447.
- COSTA, R., M. GÖTZ, N. MROTZEK, J. LOTTMANN, G. BERG and K. SMALLA, 2006b: Effect of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of different microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* **56**, 236-249.
- COSTA, R., J. F. SALLÉS, G. BERG and K. SMALLA, 2006c: Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. *Environmental Microbiology* **8**, 2136-2149.
- COSTA, R., N. C. M. GOMES, E. KRÖGERRECKLENFORT, K. OPELT, G. BERG and K. SMALLA, 2007: *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environmental Microbiology* **9**, 2260-2273.
- DEMATHEIS, F., U. ZIMMERLING, C. FLOCCO, B. KURTZ, S. VIDAL, S. KROPF and K. SMALLA, 2012: Multitrophic interaction in the rhizosphere of maize: Root feeding of Western Corn Rootworm larvae alters the microbial community composition. *PLoS ONE*, in press.
- DING, G. C., H. HEUER and K. SMALLA, 2011: Molecular Techniques of Handbook of Soil Sciences: Properties and Processes. Chapter 28-1. Second Edition, Pan Ming Huang, Yuncong Li and Malcolm E. Sumner. CRC Press 2011, Print ISBN: 978-1-4398-0305-9, eBook ISBN: 978-1-4398-0306-6.
- DING, G.-C., H. HEUER, Z. HE, J. XIE, J. ZHOU and K. SMALLA, 2012: More functional genes and convergent overall functional patterns detected by GeoChip in phenanthrene spiked soils. *FEMS Microbiology Ecology*, in press.
- GANS, J., M. WOLINSKY and J. DUNBAR, 2005: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**, 1387-1390.
- GÖTZ, M., N. C. M. GOMES, A. DRATWINSKI, R. COSTA, G. BERG, R. PEIXOTO, L. MENDONÇA-HAGLER and K. SMALLA, 2006: Survival of *gfp*-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **56**, 207-218.
- GOMES, N. C. M., H. HEUER, J. SCHÖNFELD, R. COSTA, L. HAGLER-MENDONÇA and K. SMALLA, 2001: Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil* **232**, 167-180.
- GOMES, N. C. M., O. FAGBOLA, R. COSTA, N. G. RUMJANEK, A. BUCHNER, L. MENDONÇA-HAGLER and K. SMALLA, 2003: Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3758-3766.
- GOMES, N. C. M., R. COSTA and K. SMALLA, 2004: Rapid simultaneous extraction of DNA and RNA from bulk and rhizosphere soil. Chapter 1.12: 159-169. *In* Molecular Microbial Ecology Manual. G.A. Kowalchuk, F.J. de Bruijn, I.M. Head, A.D.L. Akkermans and J.D. van Elsas, Eds., 2nd edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- GOMES, N. C. M., I. A. KOSHELEVA, W.-R. ABRAHAM and K. SMALLA, 2005: Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 21-33.
- GROSCH, R., S. DEALTRY, S. SCHREITER, G. BERG, L. MENDONÇA-HAGLER and K. SMALLA, 2012: Biocontrol of *Rhizoctonia solani*: complex interaction of biocontrol strains, pathogen and indigenous microbial community in the rhizosphere of lettuce shown by molecular methods. *Plant and Soil*, in press.
- HACKER, J. and E. CARNIEL, 2001: Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**, 376-381.
- HEUER, H., M. KRSEK, K. SMALLA and E. M. H. WELLINGTON, 1997: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of 16S rDNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3233-3241.
- HEUER, H. and K. SMALLA, 1999: Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme producing variants. *FEMS Microbiology Ecology* **28**, 357-371.
- HEUER, H., E. KRÖGERECKLENFORT, E. M. H. WELLINGTON, S. EGAN, J. D. VAN ELSAS, L. VAN OVERBEEK, J.-M. COLLARD, G. GUILLAUME, A. D. KARAGOUNI, T. L. NIKOLAKOPOULOU and K. SMALLA, 2002: Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: Prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology* **42**, 289-302.
- HEUER, H., R. M. KROPPENSTEDT, J. LOTTMANN, G. BERG and K. SMALLA, 2002: Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1325-1335.
- HEUER, H., Z. ABDO and K. SMALLA, 2008: Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiology Ecology* **65**, 361-371.
- HEUER, H., H. SCHMITT and K. SMALLA, 2011: Antibiotic resistance genes spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 236-243.
- HEUER, H., C. T. T. BINH, S. JECHALKE, C. KOPMANN, U. ZIMMERLING, E. KRÖGERECKLENFORT, T. LEDGER, B. GONZÁLEZ, E. TOP and K. SMALLA, 2012: IncP-1e plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Frontiers in Microbiology* **3** (2), 1-8.
- HEUER, H. and K. SMALLA, 2012: Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, DOI:10.1111/j.1574-6976.2012.00337.x
- KROPF, S., H. HEUER, M. GRÜNING and K. SMALLA, 2004: Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 187-195.
- MILLING, A., K. SMALLA, F. X. MAIDL, M. SCHLOTTER and J. C. MUNCH, 2004: Effect of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil* **266**, 23-39.
- MUYZER, G. and K. SMALLA, 1998: The need for DGGE and TGGE in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- NÜBEL, U., B. ENGELEN, A. FELSKE, J. SNAIRD, A. WIESHUBER, R. I. AMANN, W. LUDWIG and H. BACKHAUS, 1996: Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**, 5636-5643.
- OROS-SICHLER, M., N. C. M. GOMES, G. NEUBER and K. SMALLA, 2006: A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* **65**, 63-75.
- SMALLA, K., N. CRESSWELL, L. C. MENDONÇA-HAGLER, A. WOLTERS and J. D. VAN ELSAS, 1993: Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 78-85.
- SMALLA, K., M. OROS-SICHLER, A. MILLING, H. HEUER, S. BAUMGARTE, R. BECKER, G. NEUBER, S. KROPF, A. ULRICH and C. C. TEBBE, 2007: Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* **69**, 470-479.
- SMALLA, K., G. WIELAND, A. BUCHNER, A. ZOCK, J. PARZY, S. KAISER, N. ROSKOT, H. HEUER and G. BERG, 2001: Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4742-4750.
- SMALLA, K. and J. D. VAN ELSAS, 2010: The Soil Environment. In: *Environmental Molecular Microbiology*, W.-T. Liu and J. K. Jansson, pp. 111-130. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- VAN ELSAS, J. D., K. SMALLA and C. C. TEBBE, 2000: Extraction and analysis of microbial community nucleic acids from environmental matrices, 29-51. In: J. K. Jansson, J. D. van Elsas, and M. J. Bailey (eds) *Tracking genetically-engineered microorganisms*. Eurekah, Austin, Texas.
- WEINERT, N., R. MEINCKE, C. GOTTFELD, H. HEUER, N. C. GOMES, M. SCHLOTTER, G. BERG and K. SMALLA, 2009: Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3859-3865.
- XUE, Q.-Y., G.-C. DING, S.-M. LI, Y. YANG, C.-Z. LAN, J.-H. GUO and K. SMALLA, 2012: Rhizocompetence and antagonistic activity towards genetically diverse *Ralstonia solanacearum* strains – an improved strategy for selecting biocontrol agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, in press.