

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
**Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie**

# **Interaktion epiphyller Mikroorganismen mit pflanzlichen Geweben**

**Daniel Abanda-Nkpwatt**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab  
2. Univ.-Prof. Dr. Lukas Schreiber  
(Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Die Dissertation wurde am 10.11.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.12.2004 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2001 bis Februar 2003 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie in Zusammenarbeit mit dem Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Botanik II-Ökophysiologie und Vegetationsökologie der Universität Würzburg durchgeführt. Aufgrund einer angenommenen Professur meines Doktorvaters an der Technischen Universität München wurde die Arbeit von März 2003 bis Juni 2004 am dortigen Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, Degussa Stiftungsprofessur, fertig gestellt. Die Arbeit war Bestandteil des Sonderforschungsbereichs 567 „Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen“.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

**Abanda-Nkpwatt, D.; Schwab, W.**

Microbial transformation of aliphatic aldehydes by *Bacillus megaterium* to 2,3-Dialkyl acroleins.

*J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52(19), 5939-5942.

**Abanda-Nkpwatt, D.; Krimm, U.; Coiner, H.A.; Schreiber, L.; Schwab, W.**

Plant volatiles can minimize the growth suppression of epiphytic bacteria by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* in co-culture experiments.

*Environmental and Experimental Botany* **2004**, zur Veröffentlichung eingereicht.

**Abanda-Nkpwatt, D.; Krimm, U.; Schreiber, L.; Schwab, W.**

Dual antagonism of aldehydes and epiphytic bacteria from strawberry leaf surfaces against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* in vitro.

*BioControl* **2004**, zur Veröffentlichung eingereicht.

**Krimm, U.; Abanda-Nkpwatt, D.; Schwab, W.; Schreiber, L.**

Epiphyllic microorganisms on strawberry slants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): Identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. Zur Veröffentlichung eingereicht.

***Durch Gottes Gnade bin ich was ich bin.***

## DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab, gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, für sein stets großes Interesse an den Fortschritten dieser Arbeit, für die vielfältige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber, Institut für Ökophysiologie, IZBM, Universität Bonn, bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, Institut für allgemeine Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, danke ich für die Unterstützung bei der Koordination meines Prüfungsverfahrens.

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, gebührt mein Dank für die Unterstützung und die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl in der Zeit von Juli 2001 bis Februar 2003 geforscht zu haben.

Mein Dank gilt ebenso:

Ursula Krimm für die schöne Zusammenarbeit im Rahmen des SFB 567.

Dr. Rainer Wolf, Biozentrum der Universität Würzburg, für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Erna Schindler, Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau, Veitshöchheim, für die Einweisung und Betreuung bei den Inhibierungsversuchen und die Bereitstellung von *Botrytis cinerea* Stämmen.

Dr. Gabriella Gresser, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, für die Einweisung und Betreuung bei den Keimungsversuchen.

Dr. Ute Hentschel, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, für die Charakterisierung von *Methylobacterium extorquens*.

Dr. Mewes Boettner, Firma Organobalance in Berlin, für die Bereitstellung von *Pichia pastoris* Stämmen.

Dr. Jochen Tschiersch und Martina Müsch, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) Neuherberg, für ihr Engagement bei den Methanolmessungen mittels PTR-MS.

Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel, Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München, für die Benutzung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

Meinen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern aus den Arbeitskreisen in Freising und Würzburg für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Márta Dregus, Institut für allgemeine Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, für die zahlreichen GC-MS Messungen.

Timo Stark, Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Jochen Mähliß und Heather Coiner für die sorgfältige und kritische Durchsicht der Dissertationsarbeit bzw. der Publikations-Manuskripte.

Dem Sonderforschungsbereich SFB 567 und DEGUSSA für die finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in all den Jahren in vielfältiger Weise unterstützt haben, sowie meinen Geschwistern für ihre moralische Unterstützung und Marlyse Nathalie für ihre Geduld und Unterstützung in jeder Hinsicht.

Schließlich danke ich ganz besonders dem HERRN für seine ständige Begleitung, Führung und unermessliche Liebe und Gnade.

Möge der allmächtige und barmherzige GOTT alle segnen.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1	Blätter als Wohnräume .....	1
2	Mikrobiologie der Phyllosphäre .....	3
3	Interaktionen in der Phyllosphäre.....	4
4	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	8
<b>B</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>10</b>
1	<b>Untersuchungen an Erdbeerblättern</b> .....	<b>10</b>
1.1	Isolierung und Charakterisierung der epiphyllen Bakterien .....	10
1.2	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung .....	11
1.3	Bestimmung flüchtiger Komponenten von Erdbeerblättern .....	13
1.4	Isolierung der Drüsenhaare und Bestimmung flüchtiger Komponenten.....	15
1.5	Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie .....	16
1.6	Diskussion der Ergebnisse.....	17
2	<b>Interaktionsstudien</b> .....	<b>21</b>
2.1	Metabolisierung der flüchtigen Verbindungen von Erdbeerblättern durch epiphyllle Bakterien.....	21
2.2	Biotransformation von C <sub>8</sub> -C <sub>12</sub> Aldehyden durch <i>Bacillus megaterium</i> .....	26
2.3	Inhibierungsversuche von <i>Botrytis cinerea</i> durch epiphyllle Bakterien.....	28
2.4	Wirkung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter auf das Wachstum von <i>Botrytis cinerea</i> und epiphyllen Bakterien.....	30
2.5	Inhibierung von <i>Botrytis cinerea</i> durch epiphyllle Bakterien in Gegenwart flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter .....	33
2.6	Diskussion der Ergebnisse.....	40

<b>3</b>	<b>Interaktionen von methylotrophen Bakterien mit Pflanzen .....</b>	<b>43</b>
3.1	Methylotrophe Bakterien .....	43
3.2	Isolierung und Charakterisierung von Methylotrophen aus Erdbeerblättern.....	45
3.3	Untersuchung zur Wirkung von <i>Methylobacterium extorquens</i> ME4 auf Erdbeerkalluskulturen .....	48
3.4	Einfluss von <i>Methylobacterium extorquens</i> ME4 auf die Samenkeimung .....	48
3.5	Nachweis wachstumsfördernder Inhaltsstoffe bei <i>Methylobacterium extorquens</i> ME4.....	52
3.6	Diskussion der Ergebnisse.....	54
<b>4</b>	<b>Methanol aus wachsenden Keimlingen.....</b>	<b>56</b>
4.1	Vorkommen von Methanol in der Atmosphäre .....	56
4.2	Quelle von Methanol in Pflanzen.....	57
4.3	Verfahren zur Bestimmung von Methanol bei der Keimung .....	59
4.3.1	Oxidation von Methanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase.....	60
4.3.2	Bestimmung von Methanol mittels Protonen-Transfer- Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS).....	61
4.3.2.1	PTR-MS Grundlagen .....	61
4.3.2.2	Ergebnisse der PTR-MS Messungen .....	63
4.4	Nachweis von Methanol bei der Keimung mit Hilfe von <i>Pichia pastoris</i> als Biosensor.....	66
4.4.1	Allgemeines zu Biosensoren .....	66
4.4.2	Einsatz von <i>Pichia pastoris</i> als Biosensor zum Nachweis von Methanol in Keimblättern.....	68
4.4.3	Ergebnisse der Keimungsexperimente mit <i>Pichia pastoris</i> .....	68
4.5	Diskussion der Ergebnisse.....	71

<b>C</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL</b>	<b>73</b>
<b>1</b>	<b>Material</b>	<b>73</b>
1.1	Chemikalien	73
1.2	Enzyme	74
1.3	Mikroorganismen	74
1.4	Pflanzenmaterial	75
1.5	Adsorptionsmaterial	76
1.6	Membranfiltration	76
1.7	Dünnschichtchromatographie	76
<b>2</b>	<b>Geräte</b>	<b>77</b>
2.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	77
2.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	78
2.3	Multidimensionale Gaschromatographie mit Moving-Column- Stream Switching-System (MDGC-MCSS)	80
2.4	Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)	81
2.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	82
2.6	Mikroskopische Analysen	82
2.6.1	Lichtmikroskopie	82
2.6.2	Rasterelektronenmikroskopie	82
2.6.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	83
2.7	Schüttelinkubatoren	83
2.8	Autoklav	83
2.9	Sonstige Geräte	84
2.10	Statistische Berechnungen	84
<b>3</b>	<b>Allgemeine Arbeitsvorschriften</b>	<b>85</b>
3.1	Pufferherstellung	85
3.2	Herstellung der Wachstumsmedien	85
3.3	Weitere Nährmedien	86
3.3.1	Plate Count Agar (PCA)	86
3.3.2	Malzextrakt-Agar	86
3.3.3	M9–Methanol-Medium	87
3.3.4	Yeast Peptone Dextrose (YPD)	87



3.4	Untersuchungen an Erdbeerblättern .....	87
3.4.1	Oberflächendarstellung im Rasterelektronenmikroskop .....	87
3.4.2	Isolierung der Drüsenhaare und Identifizierung ihrer Inhaltsstoffe.....	88
3.4.3	Bestimmung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter .....	88
3.4.3.1	Tauchen der Blätter in Diethylether .....	88
3.4.3.2	Homogenisieren.....	89
3.4.3.3	Kopfraum-Analyse .....	89
3.4.4	Isolierung und Charakterisierung von Methylolefinen .....	89
3.5	Interaktionsstudien .....	90
3.5.1	Metabolisierung der flüchtigen Verbindungen der Erdbeerblattoberflächen durch epiphytische Bakterien.....	90
3.5.1.1	Vorinkubation.....	90
3.5.1.2	Substratzugabe und Inkubationsphase.....	90
3.5.1.3	Aufarbeitung der Umsetzungen und Identifizierung gebildeter Produkte .....	90
3.5.2	Biotransformation von C <sub>8</sub> -C <sub>12</sub> Aldehyden durch <i>Bacillus megaterium</i> .....	91
3.5.3	Darstellung der Aldolkondensationsprodukte .....	91
3.5.4	Inhibierungsversuche von <i>Botrytis cinerea</i> durch epiphytische Bakterien .....	95
3.5.5	Untersuchungen zur Wirkung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter auf <i>Botrytis cinerea</i> und epiphytische Bakterien....	95
3.5.6	Inhibierungsversuche von <i>Botrytis cinerea</i> durch epiphytische Bakterien in Gegenwart flüchtiger Verbindungen der Erdbeerblätter .....	96
<b>4</b>	<b><i>Methylobacterium extorquens</i> und Pflanzenwachstum.....</b>	<b>97</b>
4.1	Sterilisieren von Samen .....	97
4.2	Keimungsexperimente .....	97
4.3	Extraktion und Analyse der <i>Methylobacterium extorquens</i> ME4 Kulturlösung .....	98
4.4	Wirkung von Vitamin B <sub>12</sub> auf die Keimung von Tabaksamen.....	98

4.5	Interaktion von <i>Methylobacterium extorquens</i> mit Erdbeerkalluskulturen.....	99
<b>5</b>	<b>Analytik von Methanol bei der Keimung .....</b>	<b>100</b>
5.1	Bestimmung von Methanol mittels Protonen-Transfer- Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) .....	100
5.2	Nachweis von Methanol bei der Keimung mit Hilfe des Hefestammes <i>Pichia pastoris</i> als Biosensor.....	100
5.2.1	Wachstumsbedingungen und Induktion des Proteins .....	100
5.2.2	Keimungsexperimente von Tabaksamen mit <i>Pichia pastoris</i> Zellen und mikroskopische Untersuchung der Blätter.....	101
<b>D</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>102</b>
<b>E</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>105</b>
<b>F</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>108</b>
1	Partielle 16S rRNA Sequenzen der Methyлотроphen.....	108
2	Posterbeiträge und Vorträge .....	110
3	Abkürzungsverzeichnis .....	111
<b>G</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>114</b>
	Ehrenwörtliche Versicherung.....	140

## **A EINLEITUNG**

Die Besiedlung der Blattoberfläche mit Mikroorganismen ist seit mehr als einem Jahrhundert (De Bary, 1866) von vielen Forschern mit großem Interesse untersucht worden. Unmittelbar nach dem Blattaustrieb, werden die Blätter mit verschiedenen Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien, Hefen und Pilzen zunächst zögernd, später intensiver, besiedelt. Als Nährstoffe dienen den Mikroorganismen die Blattausscheidungen und die Guttationsflüssigkeiten (Fokkeman, 1981). Für den Mikrolebensraum auf der Pflanzenoberfläche werden die Termini Phyllosphäre (Ruinen, 1961) und Phylloplane (Kerling, 1958) benutzt. Die Mikroorganismen, die auf der Oberfläche der Blätter leben, wurden von Dickinson (1980) als „Epiphyten“ bezeichnet. Um die Besiedlungsstrategien der Mikroorganismen zu verstehen, ist es nötig, sich den Bau und die Biochemie der Blattoberfläche genauer zu betrachten.

### **1 Blätter als Wohnräume**

Grundsätzlich können alle Teile der höheren Pflanzen von Mikroorganismen besiedelt werden, angefangen von den Wurzelhaaren, über die Stängel und Blätter, bis hin zu den Samen und Früchten. Die Mikroorganismen gelangen durch Atmosphäre, Wind, Niederschlag, Insekten und auch höhere Tiere auf die Pflanzenoberflächen (Lilley *et al.*, 1997). Die Blätter stellen somit die ersten Organe der Pflanzen dar, mit denen die Mikroorganismen in Berührung kommen.

Blätter sind Anhangsorgane des Sprosses und für die höheren Pflanzen besonders typisch. Die Aufgaben von Blättern sind vielfältig und dementsprechend auch ihre Gestalt. Vor allem aber dienen Blätter der Photosynthese und der Abgabe von Wasserdampf. Bereits das junge, noch nicht voll ausdifferenzierte Blatt gliedert sich in zwei Abschnitten, nämlich in das basalwärts gelegene Unterblatt und das spitzenwärts gelegene Oberblatt. Am Aufbau der Blattfläche sind vor allem drei Gewebetypen beteiligt, nämlich das Abschlussgewebe (Epidermis), das Assimilationsgewebe (Mesophyll) und die Leitbündel.

Die Epidermis ist meist einschichtig und besteht aus lebenden Zellen. Die äußeren Zellwände der Epidermis sind häufig verdickt und zudem mit lipophilen Substanzen (Cutinen, Wachsen) imprägniert. Auf der Außenseite der Epidermis-Zellen ist ein aus Cutin bestehendes Häutchen, die Kutikula, aufgelagert. Vor allem der Kutikula verdankt die Epidermis ihre äußerst geringe Durchlässigkeit für Wasserdampf und andere Gase. Dieser Barrieren-Effekt wird durch Auflagerung von Wachsen auf die Kutikula noch verstärkt. Kutikuläre Wachse sind Mischungen aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten, in denen einzelne Verbindungsklassen (z.B. Ester langkettiger Fettsäuren, langkettige Alkohole) bzw. Einzelverbindungen dominieren können. Bei einigen Pflanzen bildet die Epidermis der Blätter Haare aus, die einzellig oder mehrzellig sein können. Auf den Blattoberflächen vieler Pflanzen sind spezialisierte auf einer Basiszelle aufsitzende Haare, die Drüsenhaare, anzutreffen. Sie können in manchen Fällen Stoffe, z.B. ätherische Öle, ausscheiden (Gershenzon *et al.*, 1992).

Der Gasaustausch und damit zugleich die Wasserdampfabgabe (Transpiration) erfolgt durch verschließbare Poren, die Stomata (Spaltöffnungen), die in regelmäßigen Abständen in die Epidermis eingelassen sind. Viele der sekundären Pflanzenmetabolite auf den Blattoberflächen wie Alkohole, Ester, Terpene, Säuren und Carbonylverbindungen werden durch die Spaltöffnungen oder über die Drüsenhaare freigesetzt (Mercier und Lindow, 2000; Schaller, 2002). Anorganische Ionen ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) und organische Verbindungen, wie Kohlenhydrate und Aminosäuren, werden beim Regen und Tau abgegeben (Jacques *et al.*, 1995).

Blattoberflächen sind aufgrund der sehr wasserabweisenden Eigenschaften der Kutikula, die die Grenzfläche zwischen der Pflanze und der sie umgebenden Atmosphäre bildet, ein sehr unwirtlicher Lebensraum mit geringer Wasser- und Nährstoffversorgung, starken Temperaturschwankungen und teilweise hoher Sonneneinstrahlung. Dennoch werden Blattoberflächen unter natürlichen Wachstumsbedingungen fast immer von einer epiphyllen Mikroflora, bestehend aus Bakterien, Hefen und Pilzen besiedelt (Andrews und Hirano, 1992; Morris *et al.*, 1996). Offensichtlich haben es bestimmte Mikroorganismen gelernt, sich in diesem extremen Habitat anzusiedeln und zu überleben. Als Nährstoffe findet man hauptsächlich pflanzliche Auswaschungen und Absonderungen in Form von Aminosäuren und Kohlenhydraten (Fiala *et al.*, 1990). Hierzu kommen noch tierische

Exkrementen und toten Mikroorganismen. Die Ausscheidung von Nährstoffen, inhibitorischen Verbindungen und flüchtigen Stoffen ist nicht gleich bleibend, sondern nimmt im Verlauf der Vegetationsperiode zu (Andrews und Harris, 2000). Chemische Analysen haben gezeigt, dass 0,2 bis 10 µg Mengen an Gesamtzucker von der Blattoberfläche eines jungen Sojablattes gewaschen werden konnten. Diese Menge würde ausreichen, um das Wachstum von  $10^7$  bis  $10^8$  Bakterien pro Blatt zu gewährleisten (Lindow und Brandl, 2003).

## 2 Mikrobiologie der Phyllosphäre

Im Rahmen seiner Untersuchungen über die Phyllosphäre schrieb der Biologe Volkmar Vareschi folgendes: „Nirgends offenbart sich die Lebenskraft der Tropen so eindringlich wie in einem von Epiphyllen überwucherten und trotzdem noch immer lebensfähigen Trägerblatt“ (Vareschi, 1918). Obwohl die Phyllosphäre stoffarm ist, wird sie dennoch von einer großen Anzahl an mikrobiellen Gemeinschaften besiedelt.

Die Kenntnisse über die qualitative Zusammensetzung der Populationen der Mikroorganismen auf Blättern sind noch unvollständiger als die in der Rhizosphäre (Kinkel, 1997). Die in den Arbeiten aus unterschiedlichen Klimazonen aufgeführten Gattungen und Arten wiederholen sich relativ häufig. Dies darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass viele schwierig zu kultivierbaren Keime nicht identifiziert werden können. Thompson und Mitarbeiter (1993) hatten aus jungen, voll entwickelten und alten Blättern von Zuckerrüben 1236 Stämme aus 78 Gattungen isoliert. Von diesen konnten 38 bekannte und zwölf unbekannte Bakterienstämme nachgewiesen werden. Die am häufigsten bestimmten Bakterien gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Aerobacter*, *Mycobacterium*, *Azotobacter*, *Achromobacter* und *Bacillus*. Bei den Hefen sind die Gattungen *Rhodotorula*, *Cryptococcus* und *Torulopsis* weit verbreitet. Zu den primären Besiedlern von Blattoberflächen gehören weiterhin die Pilze *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum* und *Epicoccum nigrum*. Einige Pilze wie *Sporobolomyces* bevorzugen die Blattoberseiten, andere wie *Cladosporium herbarum* die Blattunterseiten. Vor allem auf älteren Blättern werden darüber hinaus häufig Cyanobakterien der Gattungen

*Anabaena*, *Calotrix*, *Nostoc* und *Scytonema* gefunden. Auf Blättern und Knospen von Pflanzen im Freiland werden  $10^3$  bis  $10^7$  heterotrophe Bakterien und Hefezellen pro g Frischgewicht bestimmt (Beattie und Lindow, 1995; Andrews und Harris, 2000; Hirano und Upper, 2000). Die Verteilung ist auf dem Blatt nicht homogen. Auf der abaxialen (Unter-) Seite des Blattes befinden sich tendenziell mehr Organismen als auf der adaxialen (Ober-) Seite. Dabei sind die Mikroorganismen u. a. an Blattadern, Trichomen, Drüsen, Stomata und Vertiefungen der Kutikula anzutreffen (Blakeman, 1993; Andrews und Harris, 2000). Es ist außerdem bemerkenswert, dass auf den jüngeren oberen Blättern zehn bis hundertmal so viele Bakterien gefunden wurden wie auf älteren tieferliegenden Blättern (Yang *et al.*, 2000). Dies kann sowohl auf die unterschiedliche Staubexposition zurückgeführt werden, als auch auf eine unterschiedlich hohe Blattexsudation. Für die erste Vorstellung spricht, dass bei Pflanzen aus Gewächshäusern eine um drei bis vier Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahl auf den Endknospen und jungen Hülsen anzutreffen ist (Yang *et al.*, 2000).

Die Resistenz von Pflanzensorten gegenüber einzelnen Stämmen hat auch einen Einfluss auf die Oberflächenbesiedlung. So vermehrten sich auf den Wasserspalten einer Reissorte Stämme von *Xanthomonas campestris* je nach Resistenzeigenschaften unterschiedlich (Mew, 1978). Bei gleicher Inokulationsmenge ist bei den Stämmen, gegenüber denen die Sorte resistent ist, eine Vermehrung um den Faktor zwei innerhalb von 24 Stunden zu beobachten. Bei dem Stamm, gegenüber dem die Sorte anfällig ist, erhöht sich die Zellzahl um mehr als den Faktor zehn.

### **3 Interaktionen in der Phyllosphäre**

Die Interaktionen bilden das zentrale Feld der Ökologie. Jedes Lebewesen nimmt an einer Anzahl von Wechselbeziehungen sowohl mit anderen Organismen als auch mit nicht belebten Komponenten der Umwelt teil.

Wie bereits angedeutet, stellen Blätter die ersten Organe der Pflanzen dar, mit denen die Mikroorganismen in Berührung kommen. Daher bilden die Blattoberflächen von Pflanzen die Lebensgrundlage für zahlreiche spezialisierte Mikroorganismen wie epiphyllie Bakterien und Pilze. Die Entwicklung und Ausprägung dieser epiphyllen

Gemeinschaften ist abhängig von der Art der Trägerpflanze, dem Lebensalter der Blätter und den mikroklimatischen Parametern wie Lufttemperatur, Luftfeuchte, Licht und Niederschlägen (Jacques *et al.*, 1995). Im Zuge einer gemeinsamen Co-Evolution entstehen somit ausgeprägte biochemische und molekulare Wechselbeziehungen, die in den Gemeinschaften auf Konkurrenz, Symbiose und Interaktionen zwischen den Pflanzen und Pflanzenpathogenen, wie z.B. dem Pilz *Botrytis cinerea*, gründen.

Konkurrenz entsteht, wenn verschiedenartige Organismen dasselbe begrenzte Gut in Anspruch nehmen. Das Prinzip des Ausschlusses durch Wettbewerb besagt, dass beim Vorkommen zweier Organismen am selben Platz, die um ein gemeinsam genutztes Naturgut konkurrieren, schließlich nur einer von diesen dort überleben kann (Wilson und Lindow, 1994).

Im Normalfall besiedeln Mikroorganismen die Pflanzen und existieren mit ihr, ohne sie sichtbar zu beeinträchtigen. Erst wenn das Gleichgewicht zwischen der Wirtspflanze und den auf der Pflanze siedelnden Epiphyllen gestört ist, können auch Pathogene (Bakterien, Pilze oder Viren) die Wirtspflanze befallen. Es kommt zu massiven Schädigungen, die zum Absterben der Pflanze führen können (Lilja *et al.*, 1998). Bakterien sind in der Lage, durch Exoenzyme Zellwände zu lysieren und sich so einen Zugang zur Wirtszelle zu verschaffen. Sie können auch durch Spaltöffnungen auf der Pflanzenoberfläche in den Wirt gelangen. Eine Maispflanze besitzt über 200 Millionen Stomata mit einer jeweiligen elliptischen Porenöffnung von ca.  $90 \mu\text{m}^2$ . Wenn man die Ausmaße eines Bakteriums mit  $0,5\text{-}0,7 \mu\text{m}$  Breite und  $1,0\text{-}1,5 \mu\text{m}$  Länge annimmt, so wird deutlich, dass Stomata eine potentielle „Falle“ für Bakterien darstellen (Oßwald, 1995).

Die pathogenen Mikroorganismen bewirken sowohl kurzfristig als auch langfristig tiefgreifende Effekte auf die Pflanzen, indem sie deren photosynthetisch aktive Oberflächen zerstören. Diese Interaktionen haben im Laufe der Zeit dazu geführt, dass Pflanzen ein reiches Spektrum von Abwehrmechanismen entwickelt haben. Die Oberflächenbeschaffenheiten der Blätter stellen die ersten Abwehrreaktionen dar, mit denen Infektionen durch Pathogene verhindert werden können.

Von der Benetzbarkeit der Blätter hängt es ab, ob Wassertropfen, welche möglicherweise pathogene Sporen enthalten, auf der Blattober- oder unterseite haften bleiben können oder ob sie abperlen. Lipophile Überzüge, wie z.B.

Wachsschichten, setzen die Benetzbarkeit stark herab, die Tropfen verlieren ihre Haftung, und eine mögliche Infektion wird somit verhindert. So zeigen Weizenarten ohne Wachsüberzüge stärkeren Pathogenbefall der Blätter als solche mit Überzug (Oßwald, 1995).

Auch die Behaarung der Blätter kann zur Resistenz beitragen. Haare verhindern, dass Tautropfen mit der Epidermis in Kontakt treten. Die Sporen können zwar bei günstigen Bedingungen (hohe Luftfeuchtigkeit und Wärme) im Tropfen auskeimen, erreichen aber die Blattoberfläche nicht und verlieren sehr bald ihre Virulenz. Die Dicke der Epidermisauflagerungen, vor allem Cutin und Wachse, kann ebenfalls eine Rolle bei der Resistenz spielen, besonders bei Pathogenen, die mechanisch in die Pflanzen eindringen (Oßwald, 1995).

Viele Pflanzen können die Attacke einiger Schaderreger nicht erfolgreich abwehren. Die befallenen Pflanzen werden durch das Pathogen geschädigt oder gehen zugrunde. Derartige Epidemien können heute mit verschiedenen Fungiziden kontrolliert und bekämpft werden. Dies bedeutet aber nicht nur erhebliche Kosten und zusätzliche Arbeit für die Landwirtschaft, sondern die Fungizide hinterlassen auch Rückstände in den Früchten und im Boden. Schlimmer noch, die häufige Anwendung von Fungiziden führt in der Regel zu Resistenzen gegen das angewandte Mittel, so dass ständig neuartige Fungizide entwickelt werden müssen. Inzwischen werden andere Lösungen intensiv gesucht. Ein Ansatz ist zum Beispiel das Ausbringen spezieller Mikroorganismen auf die Pflanzen. Als natürliche Antagonisten besitzen sie die Fähigkeit, schädliche Pilze und Bakterien zu unterdrücken oder abzutöten (Andrews, 1992; Filonow *et al.*, 1996; Helbig *et al.*, 1998; Guinebretiere *et al.*, 2000; Berto *et al.*, 2001). In jüngster Zeit wird zunehmend an der wichtigen Frage geforscht, in welchem Maße die Pflanzenstoffe als Antagonisten zur Bekämpfung pathogener Organismen helfen können.

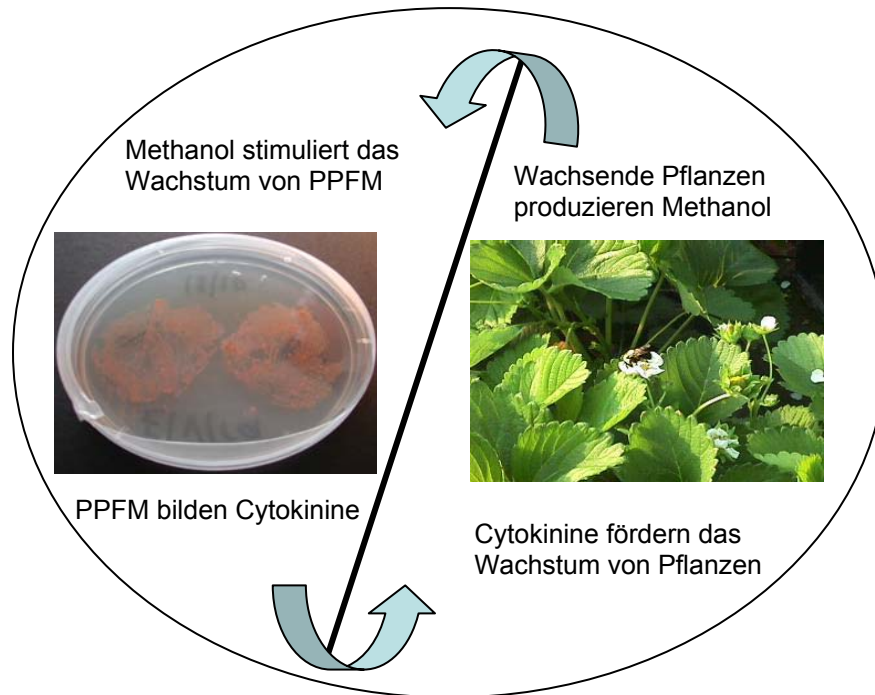
Während der Vegetationsperiode produzieren Pflanzen eine Reihe von chemischen Abwehrstoffen, die man allgemein den sekundären Pflanzenmetaboliten zurechnet. Das Vermögen der Pflanzen, solche unverträglichen oder giftigen Substanzen zu erzeugen und sie in ihren Geweben zu speichern, verleiht ihnen einen gewaltigen Wettbewerbsvorteil (Raven *et al.*, 2000). Diese chemischen Stoffe stellen in der Natur die wichtigsten Faktoren zur Bekämpfung pflanzenfressender Insekten oder



Krankheitserreger dar (Corre *et al.*, 1990; Lucchini *et al.*, 1990; Hamilton-Kemp *et al.*, 1992; Pattnaik *et al.*, 1997; Trombetta *et al.*, 2002).

In den symbiotischen Gemeinschaften leben Organismen zweier verschiedener Arten zu beiderseitigem Nutzen zusammen. Das klassische Beispiel findet sich in der Beziehung zwischen den Leguminosen und Stickstoff-bindenden Bakterien („Knöllchenbakterien“), die in den Wurzeln der Pflanzen in Wurzelknöllchen leben. Die Bakterien dienen der Pflanzen als Stickstofflieferant und erhalten im Gegenzug Nährstoffe vom Wirt (Raven *et al.*, 2000).

Zabetakis und Mitarbeiter beobachteten, dass in Kalluskulturen von Erdbeeren erst nach zufälliger Kontamination mit dem Mikroorganismus *Methylobacterium extorquens* der charakteristische Erdbeeraromastoff (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon) nachgewiesen werden konnte. Da der Biosyntheseweg dieses Aromastoffes bis heute nicht genau bekannt ist, postulierten die Autoren, dass die Synthese in der intakten Pflanze auf einer gemeinsamen Leistung der interagierenden Partner Mikroorganismus und Erdbeerpflanze zurückzuführen sein könnte (Zabetakis *et al.*, 1997). Weiterführende Arbeiten berichten über die enge symbiotische Beziehung zwischen methylo trophen Bakterien und Pflanzen. So konnte gezeigt werden, dass die Methylo trophen pflanzliche Hormone, wie z.B. Cytokinine, synthetisieren können (Doronina *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 1997). Es wurde daher eine Symbiose von Methylo trophen mit pflanzlichen Geweben vorgeschlagen (Abb. 1). Diese soll auf dem so genannten Methanol-Zyklus basieren, bei dem Pflanzen Methanol als Abfallprodukt freisetzen und dieses von methylo trophen Bakterien als Nahrungsquelle verwertet wird. Die Bakterien stellen den Pflanzen wiederum Cytokinine zur Verfügung (Joshi und Holland, 1999).



**Abb. 1:** Postuliertes Model für die Interaktion von Methylotröpfen (PPFM = Pink Pigmented Facultative Methylotrrophs) mit Pflanzen (Joshi und Holland, 1999).

#### 4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Auf der Grundlage der oben beschriebenen Bedeutung der sekundären Pflanzenmetabolite und der postulierten Interaktionen zwischen Methylotröpfen und Pflanzen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit die Wechselbeziehungen von epiphyllen Mikroorganismen mit pflanzlichen Systemen auf molekularer Ebene genauer zu erforschen. Die Aufgaben im Einzelnen waren:

- a) die Isolierung und Identifizierung flüchtiger Verbindungen aus Blättern,
- b) die Untersuchung des Effektes der flüchtigen Verbindungen auf das Wachstum von nicht-pathogenen und pathogenen epiphyllen Mikroorganismen,
- c) die Isolierung und Charakterisierung von methylotröpfen Bakterien,

- d) die Untersuchung des Einflusses von methylo trophen Bakterien auf das Keimverhalten von Samen,
- e) die Emission von Methanol durch keimende Pflanzen.

Zur Isolierung flüchtiger Verbindungen und Methylo trophen wurden die Blätter der Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa*) ausgewählt. Für die Untersuchungen zur Wirkung von Methylo trophen auf keimende Pflanzen und der Methanolbildung durch Pflanzen wurden verschiedene Samensorten in Keimungsexperimenten eingesetzt.

Zusammenfassend sollte in dieser Arbeit geklärt werden, in welchem Umfang eine Interaktion zwischen epiphyllen Bakterien und Pflanze für beide Partner von Vorteil ist.

## B ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1 Untersuchungen an Erdbeerblättern

#### 1.1 Isolierung und Charakterisierung der epiphyllen Bakterien

Die Isolierung und Charakterisierung epiphyller Bakterien wurde von Frau U. Krimm, Arbeitskreis Prof. Schreiber, im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Krimm, 2001). Hierbei sind die Epiphyllen zunächst durch das Abdrücken der Ober- und Unterseiten von Erdbeerblättern oder -früchten auf LB-Agar gewonnen und die einzelnen Kolonien anschließend isoliert worden. Anhand biochemischer Eigenschaften und der 16S rDNA-Analyse konnten elf epiphylle Bakterienstämme charakterisiert werden (Tab. B-1).

Aufgrund der 16S rDNA-Sequenzen und weiterer chemotaxonomischer Resultate ließen sich die sequenzierten Isolate vier verschiedenen Gattungen zuordnen, wobei die Pseudomonaden die am häufigsten vorkommende Bakteriengattung darstellten. Diese Isolate sind in den anschließenden, weiterführenden Versuchen zur Interaktion von epiphyllen Bakterien mit Blattoberflächen eingesetzt worden.

**Tab. B-1:** Liste der elf anhand der 16S rDNA Sequenzen identifizierten Eigenisolate von Erdbeeroberflächen und die Ergebnisse deren Analyse mit BLAST<sup>a</sup>. Die Identität mit dem besten Treffer (in Prozent) ist angegeben. Der Code in eckigen Klammern deutet auf die Datenbanknummer in NCBI<sup>b</sup> hin. (A, B Freilandpflanzen; BUS Blattunterseite; BOS Blattoberseite; RF rote Frucht).

Isolat	Quelle	Bester Treffer	Identität in %
I2 [AY131214]	A, BUS	<i>Pseudomonas</i> sp. NZ099	99,7
I3 [AY131215]	A, RF	<i>Pseudomonas lurida</i>	99,9
I4 [AY131223]	A, BUS	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	98,4
I6 [AY131216]	A, BOS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,1

Fortsetzung von Tab. B-1

I7 [AY131217]	A, BOS	<i>Bacillus cereus</i> Delaporte	99,9
I8 [AY131218]	B, BOS	<i>Pseudomonas orientalis</i>	99,7
I21 [AY131225]	A, BOS	<i>Arthrobacter agilis</i>	99,3
I24 [AY131219]	A, BUS	<i>Pseudomonas parafulva</i>	100
I25 [AY131220]	A, BUS	<i>Bacillus mycoides</i>	100
		<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	100
I27 [AY131221]	B, BUS	<i>Pseudomonas parafulva</i>	100
I29 [AY131222]	B, LOS	<i>Bacillus megaterium</i>	99,7

<sup>a</sup> BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

<sup>b</sup> NCBI: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.>)

## 1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

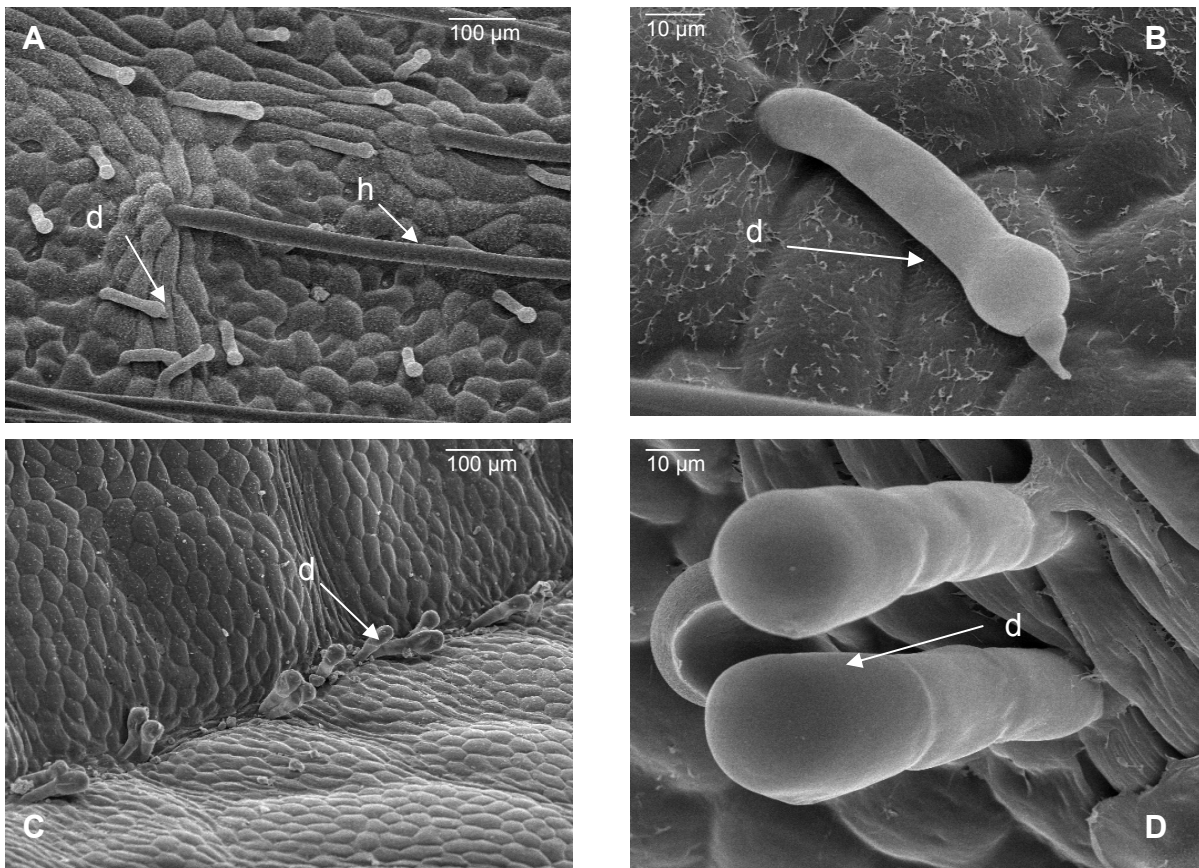
Pflanzen besitzen epidermale Anhangsgebilde verschiedener Form, Struktur und Funktion auf der Oberfläche ihrer Blätter, die als Trichome bezeichnet werden. Sie treten als Schutz-, Stütz- und Drüsenhaare in Form von Schuppen und verschiedenen Papillen auf. Es gibt verschiedene Techniken mit denen der strukturelle Aufbau von Blattoberflächen dargestellt werden kann. Dazu zählen die Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie die mikroskopische Analyse von Kunststoffabdrücken (Sengbusch, 2000). Mit dem Rasterelektronenmikroskop ist es möglich eine Oberfläche mittels eines sehr fein gebündelten Elektronenstrahls abzutasten. Im Gegensatz zur Vergrößerung eines Lichtmikroskops (maximal ca. tausendfach) kann mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops eine Vergrößerung bis zu hunderttausendfach erreicht werden.

Die Ober- und Unterseite von Erdbeerblättern der Sorte Elsanta wurde nach Vorbehandlung rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die REM-Aufnahmen in Abbildung B-1 zeigen, dass auf den Erdbeerblattober- und unterseiten nur Drüsenhaare mit einzelligen Köpfchen beobachtet werden konnten. Dabei erschienen die Drüsenhaare auf der Blattunterseite gleichmäßig verteilt, während sie auf der Blattoberseite nur auf den Leitbündeln zu finden waren. Gershenson und Mitarbeiter (1992) hatten gezeigt, dass Drüsenhaare auf den Blattoberflächen

verschiedener Pflanzen zweierlei aufgebaut sind. Die einen bestehen aus einzelligen Köpfchen, die sog. „capitate glands“, während die anderen vielzellige Köpfchen, die sog. „peltate glands“ enthalten. Auf den Oberflächen der Erdbeerblätter konnten nur die „capitate glands“ nachgewiesen werden.

Die mikroskopischen Analysen zeigten außerdem ausgesprochen lange, einzellige und unverzweigte Haare. Auf der Blattunterseite waren die Haare regelmäßig angeordnet und stets in annähernd gleichen Abständen voneinander angelegt. Auf der Blattoberseite dagegen kamen die Haare selten vor.

Obwohl lichtmikroskopische Aufnahmen epiphyll Mikroorganismen auf den Blattoberflächen zeigten (Krimm, 2001), konnte dieses Ergebnis bei den REM-Aufnahmen nicht bestätigt werden. Während der Vorbehandlung der Blätter für die REM-Aufnahmen wurden die epiphyllen Mikroorganismen vermutlich durch das Waschen entfernt.



**Abb. B- 1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Erdbeerblattunterseite (A, B) und -blattoberseite (C, D). (d: Drüsenhaar , h: Haare).

### 1.3 Bestimmung flüchtiger Komponenten von Erdbeerblättern

Flüchtige Komponenten der Blätter können prinzipiell, neben Kohlenhydraten und Aminosäuren, als Nährstoffe für epiphyll Mikroorganismen dienen. Blätter von im Freiland gewachsenen Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa*) wurden deshalb auf ihre flüchtigen Substanzen hin untersucht. Für die Isolierung der flüchtigen Komponenten sind drei unterschiedliche Verfahren angewandt worden:

- (i) das Tauchen der Blätter in Diethylether,
- (ii) das Homogenisieren der Blätter mit Wasser und anschließende Extraktion mit Diethylether,
- (iii) die Kopfraum-Analyse (die Headspace-Analyse).

Die Blätter folgender Erdbeersorten wurden für die Identifizierung flüchtiger Komponenten analysiert: Hummy, Elsanta, Elvira und White Pine. Die in Tabelle B-2 dargestellten Ergebnisse der gaschromatographisch-massenspektrometrischen (GC-MS) Analyse zeigen die wichtigsten flüchtigen Blatthaltsstoffe der Erdbeerpflanzen. In den Blättern der untersuchten Erdbeersorten wurden nahezu die gleichen Verbindungen ermittelt. Die am stärksten vertretenen Substanzklassen waren Aldehyde, Alkohole, Ester, Säuren und Terpene. Je nach Behandlungsmethode gehörten (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexenal, Nonanal, R,S-Linalool, Citronellol, (Z)-3-Hexenol, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol mengenmäßig zu den wichtigsten flüchtigen Verbindungen der Erdbeerblätter.

Die C<sub>6</sub>-Aldehyde Hexanal, (E)-2-Hexenal und (Z)-3-Hexenal konnten nur in homogenisierten Extrakten und zum Teil durch die Kopfraum-Analyse nachgewiesen werden. Da bei diesen Methoden die Blätter offensichtlich verletzt wurden, kam es zur Dekompartimentierung der Zellen, wobei die C<sub>6</sub>-Aldehyde gebildet worden sind. Die C<sub>6</sub>-Aldehyde entstehen bei der enzymatischen Oxidation von ungesättigten Fettsäuren durch Lipoxygenasen (Heiden *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse zeigten, dass C<sub>6</sub>-Aldehyde nicht als native Bestandteile der intakten Blätter vorkommen, sondern sie entstehen nur dann, wenn das Blatt verletzt ist.

Das 1-Penten-3-ol und (Z)-3-Hexenol werden ebenfalls als Produkte des Lipoxygenase-Syntheseweges beschrieben (Fisher *et al.*, 2003), dennoch wurden diese Verbindungen auch in Tauch-Extrakten gefunden. 1-Penten-3-ol und (Z)-3-Hexenol gehören somit zu den nativen Verbindungen der Erdbeerblattoberflächen. Benzaldehyd, Hexylacetat und Methylsalicylat wurden nur bei der Kopfraum-Analyse identifiziert. (Z)-3-Hexenol, R,S-Linalool, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol und Nonanal sind bei den drei angewandten Techniken in höheren Mengen nachgewiesen worden, während 1-Penten-3-ol, (Z)-2-Buten-1-ol und die Terpene  $\alpha$ -Terpineol, Myrtenol, Geraniol in geringeren Mengen vorkamen.

Im Gegensatz zum Homogenat und der Kopfraum-Analyse waren beim Einlegen der Blätter in Diethylether keine C<sub>6</sub>-Aldehyde entstanden. Damit stellte das Eintauchen in Diethylether die Methode dar, bei der die wenigsten Artefakte produziert wurden.

**Tab. B-2:** Flüchtige Verbindungen, die in Erdbeerblatt-Extrakten mittels GC-MS identifiziert wurden. Blattextrakte wurden durch Homogenisierung und Extraktion, Tauchen in Diethylether und dynamische Kopfraum-Analyse erhalten. Konzentration [mg/kg Frischgewicht]: (+) 0,01-0,1; (++) 0,1-1,0; (+++) >1,0; (-) nicht nachweisbar.

Verbindung	Homogenat	Tauchen	Kopfraum-Analyse
Hexanal	+	-	-
(Z)-3-Hexenal	++	-	+
(E)-2-Hexenal	+++	-	+
Nonanal	++	+	+
Decanal	++	+	+
Benzaldehyd	-	-	+
1-Penten-3-ol	+	+	+
(Z)-2-Buten-1-ol	+	+	+
(Z)-3-Hexenol	+++	+++	+++
R,S-Linalool	++	+++	++
1-Nonanol	+	+	++



Fortsetzung Tab. B-2

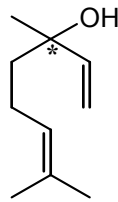
$\alpha$ -Terpineol	+	+	+
Citronellol	++	++	+
Myrtenol	+	+	+
Geraniol	++	+	+
Benzylalkohol	+++	+++	+++
2-Phenylethanol	+++	++	+++
(Z)-3-Hexenylacetat	+	+	+
Hexylacetat	-	-	+
Methylsalicylat	-	-	+
Essigsäure	++	+	++
Nonansäure	+	+	+
Benzoessäure	+	+	++
Decansäure	-	+	-

#### 1.4 Isolierung der Drüsenhaare und Bestimmung flüchtiger Komponenten

Drüsenhaare sind bekannt als Syntheseorte verschiedener Terpene und anderer sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (Gang *et al.*, 2001). Isolierte Drüsenhaare von Erdbeerblättern wurden deshalb auf ihre sekundären Metabolite hin untersucht. Dazu sind die Drüsenhaare von den Erdbeerblättern durch Schütteln in Pufferlösung abgetrennt und auf einem Filter mit 20  $\mu\text{m}$  Porengröße gesammelt worden. Nach Extraktion mit Diethylether wurden die flüchtigen Komponenten anschließend mittels GC-MS analysiert.

Die GC-MS Ergebnisse zeigten, dass in den Drüsenhaaren der Erdbeerblätter nur R,S-Linalool und Nonanal als flüchtige Komponenten vorlagen. Die anderen Komponenten, z.B. Benzylalkohol oder 2-Phenylethanol, waren dagegen nicht nachweisbar, jedoch im durchgelaufenen Filtrat enthalten. Somit war anzunehmen, dass R,S-Linalool und Nonanal in den Drüsenhaaren akkumulieren, während Benzylalkohol und 2-Phenylethanol durch die Kutikula oder Stomata emittiert werden.

### 1.5 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von Linalool mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie



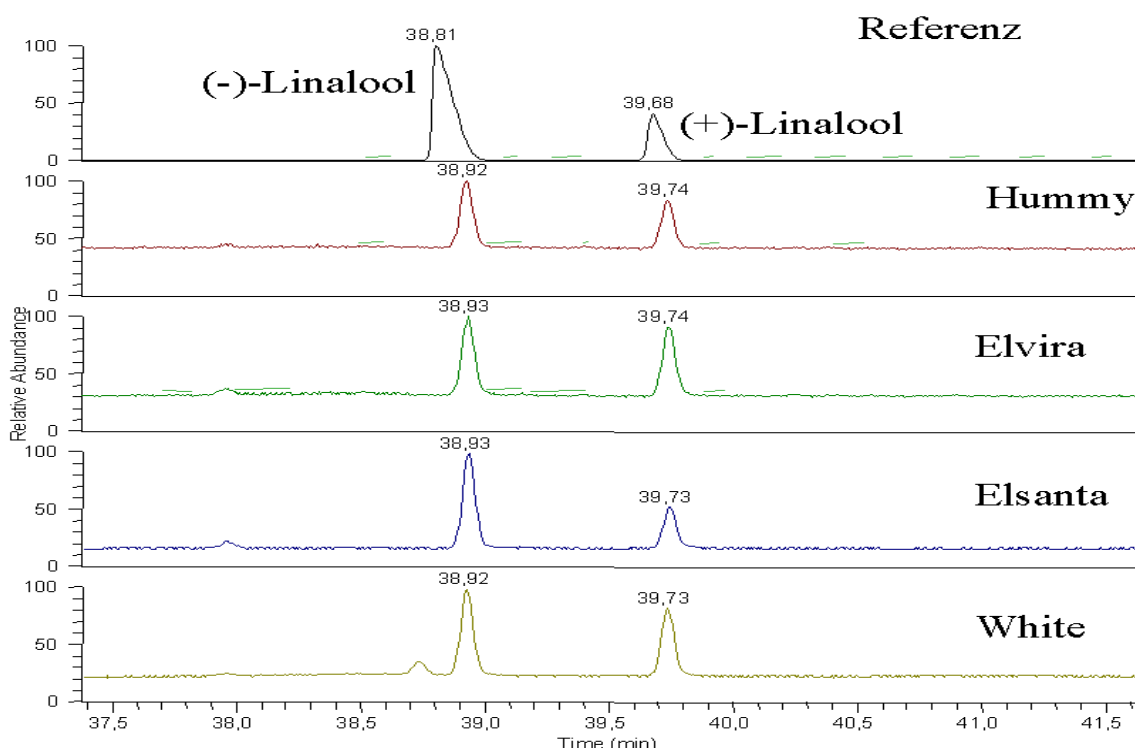
Linalool (chirales Zentrum \* )

Als aromabestimmende Komponente kommt Linalool enantiomerrein (S-Enantiomer) in Erdbeerfrüchten vor (Bernreuther und Schreier, 1991). Auch in den Erdbeerblättern wurde Linalool als wichtige flüchtige Verbindung identifiziert und deshalb dessen Enantiomerenverhältnis untersucht.

Für die Enantiomerenanalytik von Aromastoffen mittels multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS) wurde die etablierte Kombination aus einer Vorsäule (achirale Säule) und einer Hauptsäule (chirale Säule) verwendet (Mosandl, 1995). Im Analysenverlauf ist der Extrakt auf der Vorsäule aufgetrennt und nur die zu bestimmende chirale Verbindung selektiv mittels einer Säulenschaltung zur Trennung der Enantiomere auf die chirale Hauptsäule übertragen worden. Zur getrennten Steuerung der Temperaturgradienten für Vor- und Hauptsäule wurde ein Doppelofensystem verwendet. Eine spezielle Säulenschaltung verband beide stationären Phasen miteinander und ermöglichte so einen Transfer der Zielverbindung. Ein Massenspektrometer diente als Detektor.

Wie in Abbildung B-2 ersichtlich, wurden nahezu razemische Gemische bei allen untersuchten Erdbeerblattsorten ermittelt. Das Enantiomerenverhältnis von Linalool ist aus dem Verhältnis der Peakflächen ermittelt worden. Es ergaben sich Werte von 54 bis 69 % für R-(-)-Linalool zu 31 bis 46 % für S-(+)-Linalool.

Unter Berücksichtigung der von Bernreuter (1991) publizierten Ergebnisse lässt sich somit annehmen, dass ein anderes oder zusätzliches Enzym für die Bildung von R,S-Linalool in den Erdbeerblättern verantwortlich ist.



**Abb. B-2:** Ermittlung des Enantiomerenverhältnisses von R(-)-, und S-(+)-Linalool, welches aus den Drüsenhaaren von Erdbeerblättern isoliert wurde. MDGC-MS-Analyse der Diethylether-Extrakte von Erdbeerblättern verschiedener Sorten.

## 1.6 Diskussion der Ergebnisse

Wie bei allen bisher untersuchten Pflanzen konnten auch von Blättern und Früchten der Erdbeersorte *Fragaria x ananassa* var. Elsanta zahlreiche Mikroorganismen isoliert werden. Anhand der 16S rDNA-Analyse und weiterer biochemischer Eigenschaften sind elf epiphyllle Bakterienstämme charakterisiert worden (Krimm, 2001). Die qualitative Zusammensetzung der Mikroorganismen-Populationen entspricht nahezu der Zusammensetzung der auf den Blattoberflächen anderer Pflanzenarten isolierten Mikroorganismen (Blakeman und Brodie, 1977; Jacques *et al.*, 1995; Lindow und Anderson, 1996; Leveau und Lindow, 2000). Allerdings ist bekannt, dass ein hoher Prozentsatz der identifizierten Organismen bisher noch nicht beschrieben wurden, weil viele nicht kultivierbar sind (Yang *et al.*, 2001).

Um auf den Blattoberflächen wachsen zu können, bedürfen Mikroorganismen ausreichender Nährstoffquellen (Lindow und Brandl 2003; Mornier und Lindow, 2004). Leitbündel, die dem Ferntransport von Wasser, Nährsalzen, Zuckern und Aminosäuren dienen und somit Nährstoffe an die Oberfläche abgeben können, stehen den Mikroorganismen als gute Lieferanten zur Verfügung. Auf den Leitbündeln sind bereits hohe Konzentrationen an Mikroorganismen festgestellt worden (Blakeman, 1993; Andrews und Harris, 2000). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten gravierende Unterschiede in der Besiedlung der Blattoberseiten und -unterseiten durch Mikroorganismen. Auf den Blattoberseiten waren durchgehend weniger Organismen zu sehen als auf den Blattunterseiten. Auf den Blattoberseiten befanden sich die epiphyllen Mikroorganismen vor allem auf den Blattadern. Entlang der Blattadern waren viele Drüsenhaare, sowohl auf den Blattoberseiten als auch –unterseiten, anzutreffen, auf denen sich die Mikroorganismen bevorzugt ansiedelten (Krimm, 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass die in den Drüsenhaaren gebildeten Stoffe das Wachstum der epiphyllen Mikroorganismen unterstützen.

Aus Erdbeerblättern wurden verschiedene flüchtige Verbindungen aus der Klasse der Alkohole, Ester, Terpene, Säuren und Carbonylverbindungen isoliert und identifiziert. Mengenmäßig gehörten Nonanal, R,S-Linalool, Citronellol, (Z)-3-Hexenol, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol zu den wichtigsten flüchtigen Verbindungen der Erdbeerblätter. Im Einklang mit durchgeführten Versuchen wurden diese Stoffe bereits in Blättern von *Fragaria x vesca*, *F. x ananassa* und anderen Pflanzenarten beschrieben (Pyysalo *et al.*, 1979; Potter *et al.*, 1990; Hamilton-Kemp *et al.*, 1996; Fleisher, 2000). In intakten Blättern ließen sich keine C<sub>6</sub>-Aldehyde (Hexanal, (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexenal) nachweisen. Erst als die Blätter verletzt wurden, konnten die Aldehyde bestimmt werden. Die C<sub>6</sub>-Aldehyde bilden sich bei der enzymatischen Oxidation von ungesättigten Fettsäuren durch Lipoxygenasen (Heiden *et al.*, 2003). Diese Verbindungen sind schon länger als chemische Abwehrstoffe gegen Mikroorganismen und Insekten bekannt (Hamilton-Kemp *et al.*, 2003; Campeol *et al.*, 2003). Treten Feinde auf die Blattoberflächen auf, kann durch Verletzung blitzschnell eine hohe lokale Konzentration der Verteidigungsstoffe erzielt werden (Paramonov *et al.*, 2000). Somit stellen die C<sub>6</sub>-Aldehyde im Gegensatz zu

den erstgenannten Verbindungen keine potentiellen Nährstoffe für epiphyllie Bakterien auf intakten Blättern dar.

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte die Struktur der Erdbeerblattoberfläche sichtbar gemacht werden. Nur Drüsenhaare mit einzelligen Köpfchen sog. „capitate glands“ waren neben langen Trichomen zu erkennen. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass Drüsenhaare auf den Erdbeerblattoberseiten und -unterseiten unterschiedlich verteilt waren. Während sie auf der gesamten Blattunterseite anzutreffen waren, wurden sie auf der Blattoberseite nur auf den Leitbündeln beobachtet. Bei Blättern von *Origanum x intercedens* ist ein ähnliches Phänomen beschrieben worden (Bosabalidis und Skoula, 1996). Obwohl in dieser Studie Drüsenhaare mit vielzelligen Köpfchen, die sog. „peltate glands“, nachgewiesen wurden, hatten die Autoren festgestellt, dass die Drüsenhaare auf der Blattunterseite, etwa 21789 Stücke pro Blatt, dreizehnmal häufiger auftraten als auf der Blattoberseite mit 1739 Drüsenhaaren pro Blatt. Des Weiteren konnten sie ebenfalls feststellen, dass die Drüsenhaare auf den Blattunterseiten gleichmäßig verteilt waren, während sie auf den Blattoberseiten tendenziell auf den Leitbündeln anzutreffen waren. Die Frage nach dem Sinn der unterschiedlichen Verteilung der Drüsenhaare auf den Erdbeerblattoberseiten und -unterseiten bleibt jedoch ungeklärt.

Zahlreiche Studien zeigten bereits, dass die Drüsenhaare verschiedene Substanzklassen enthalten. Besonders häufig werden Flavonoide, aliphatische Aldehyde und Terpene nachgewiesen (Gershenzon *et al.*, 1992; McCaskill und Croteau, 1995; Bosabalidis und Skoula, 1996; Gang *et al.*, 2001). So konnten Bosabalidis und Skoula (1996) aus den Oreganodrüsenhaaren (*Origanum x intercedens*) die Terpene Carvacrol und Borneol identifizieren. Bei Katzenminze (*Nepeta racemosa*) sind *cis*- und *trans*-Nepelactone nachgewiesen worden (Clark *et al.*, 1997). Aus den Drüsenhaaren der Erdbeerblätter konnten R,S-Linalool und Nonanal isoliert und identifiziert werden, wobei R,S-Linalool annähernd in racemischer Form vorlag. Engel und Mitarbeiter hatten aus den Drüsenhaaren von den Stieleicheblättern (*Quercus robur* L.) verschiedene Verbindungen isoliert und identifiziert, wobei Linalool und Nonanal in Spuren nachgewiesen werden konnten. Die Konfiguration von Linalool blieb allerdings ungeklärt (Engel *et al.*, 1993).

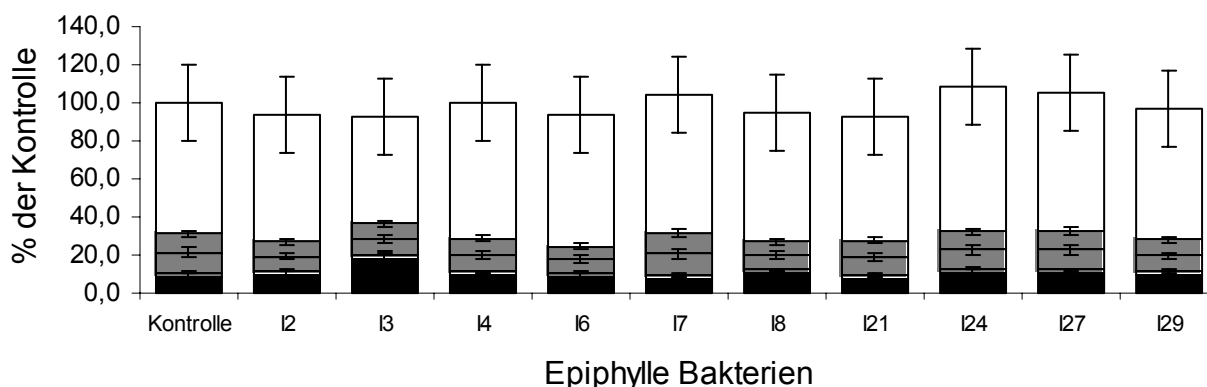
Aufgrund des Enantiomerenverhältnisses und im Vergleich zu dem von Bernreuter (1991) erzielten Ergebnis, wonach S-Linalool in Erdbeerfrüchten enantiomerrein vorliegt, kann vermutet werden, dass sich die Bildung von R,S-Linalool in Blättern von der Bildung in Erdbeerfrüchten unterscheidet. Ein weiteres noch unbekanntes Enzym muß, im Gegensatz zu dem aus Erdbeerfrüchten charakterisierten Enzym S-Linaloolsynthase, für die Bildung von Linalool in Erdbeerblättern verantwortlich sein (Aharoni *et al.*, 2004).

## 2. Interaktionsstudien

### 2.1 Metabolisierung der flüchtigen Verbindungen von Erdbeerblättern durch epiphyllie Bakterien

Vorversuche zeigten, dass die Erdbeerblattkomponenten Benzylalkohol, R,S-Linalool, Nonanal und 2-Phenylethanol von den epiphyllen Bakterien nicht als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt werden konnten. Deshalb wurden die Metabolisierungen dieser Verbindungen durch die von Erdbeerblättern isolierten epiphyllen Bakterien in Gegenwart von D-Glukose als zusätzliche Nährstoffquelle untersucht. Hierzu sind die jeweiligen Substanzen in Kulturmedien mit Bakterien gegeben und anschließend für drei Tage inkubiert worden. Die Lösungen wurden mit Diethylether extrahiert und die Extrakte mittels GC-MS analysiert. In der gleichen Weise ist ein Kontrollansatz ohne Mikroorganismen durchgeführt worden.

Wie aus der Abbildung B-3 hervorgeht, zeigten die gaschromatographischen Analysen, dass R,S-Linalool von den epiphyllen Bakterien kaum verstoffwechselt wurde. Nur mit dem Stamm I3 konnte eine geringfügig veränderte Produktzusammensetzung gegenüber dem Kontrollansatz erhalten werden. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wurde R,S-Linalool bereits ohne Bakterien oxidativ zu E- und Z-Linalooloxid furanoid, E- und Z- Linalooloxid pyranoid, 6,7-Epoxylinool, 2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol und 2,6-Dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol umgesetzt. Die Extrakte der bakteriellen Ansätze lieferten identische Ergebnisse.



**Abb. B-3:** Metabolisierungen von R,S-Linalool durch epiphyllie Bakterien. R,S-Linalool (□) wurde zu E-/Z-Linalooloxid furanoid (▨/▩), 2,6-Dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol (▧) und anderen Metaboliten (■) umgesetzt. R,S-Linalool wurde nicht entscheidend durch die Epiphyllen verstoffwechselt.

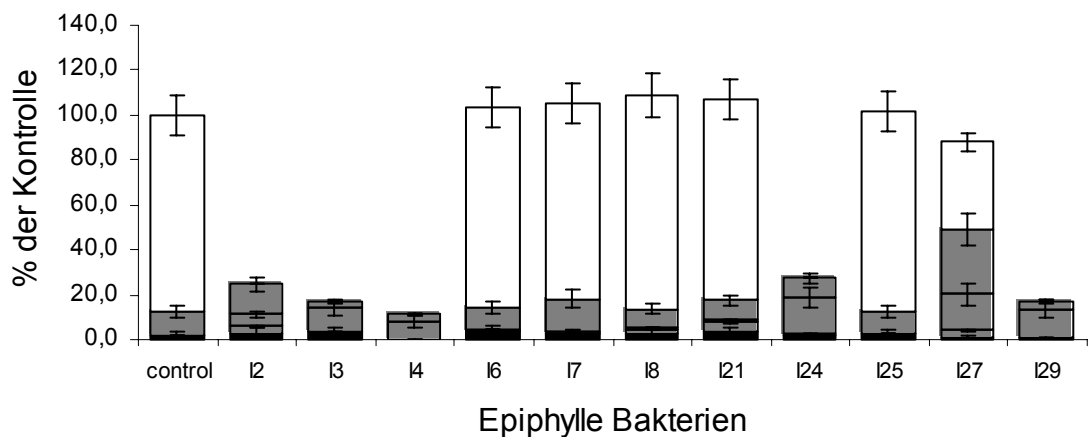
Im Gegensatz zu R,S-Linalool wurde Nonanal durch die Hälfte der epiphyllen Bakterien umgesetzt (Abb. B-4). Nonansäure war der Hauptmetabolit sowohl im Kontrollansatz als auch bei den Stämmen I6, I7, I8, I21, I25 und I27. Die Stämme I2, I3, I4, I24, I27 und I29 konnten Nonanal bzw. Nonansäure zu weiteren Produkten metabolisieren. Dabei wurde (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein als Hauptmetabolit gebildet. (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein entsteht bei der Aldolkondensationsreaktion zweier Moleküle von Nonanal. In Blindversuchen ohne Bakterien wurde (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein nicht identifiziert. In zusätzlichen Experimenten mit Nonansäure anstelle von Nonanal konnte außerdem gezeigt werden, dass die Säure nicht als Vorläufer für die Bildung von (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein fungierte. Somit wurde eindeutig gezeigt, dass die Bildung von 2-Heptyl-3-octylacrolein enzymatisch katalysiert ist und die bei der Metabolisierung gebildete Säure keine Rolle bei der Kondensationsreaktion spielt. Die Wiederfindung an Nonanalprodukten war bei den Umsetzungen der epiphyllen Bakterien I2, I3, I4, I24, I27 und I29 sehr gering, so dass von einer sehr hohen Abbauleistung durch die Epiphyllen ausgegangen werden musste. 1-Nonanol, 6-Oxononanol, (E)-2-Nonenol, Methylnonanoat, (E)-2-Nonenal, Ethylnonanoat und Nonanamid wurden außerdem in geringen Mengen in den Kulturmedien von I2, I3, I4, I24, I27 und I29 identifiziert (Abb. B-5).

Mehr als 98 % der zugesetzten Menge an Benzylalkohol konnten im Kontrollansatz ohne Bakterien und im Kulturmedium mit I21 nach drei Inkubationstagen nachgewiesen werden (Abb. B-6). Die anderen Bakterien konnten Benzylalkohol zumindest zu Benzoesäure metabolisieren. Weitere Metabolite wie Benzaldehyd, Methylbenzoat, 4-Hydroxyanisol und Benzylacetat wurden in geringeren Mengen gebildet (Abb. B-7).

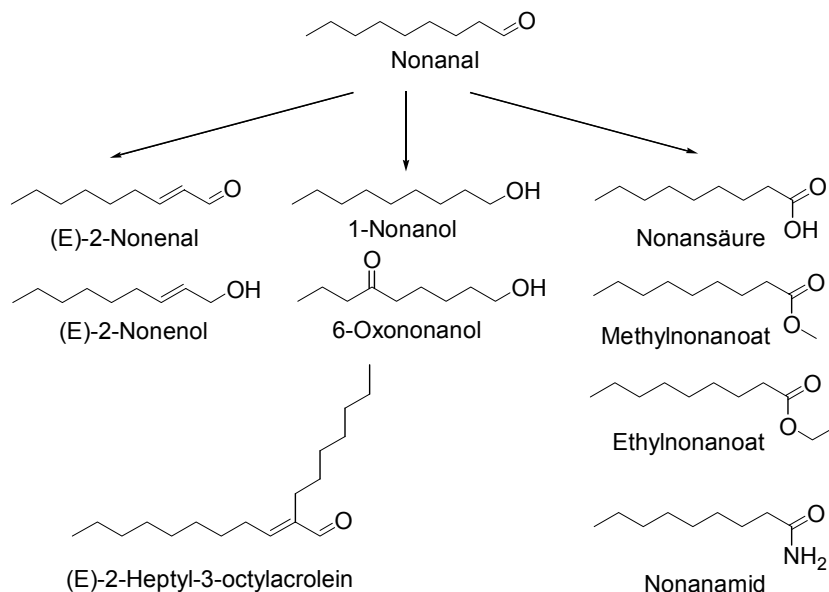
Die Metabolisierung von 2-Phenylethanol lieferte ähnliche Ergebnisse wie die von Benzylalkohol. Mehr als 98 % vom angesetzten Alkohol sind im Kontrollansatz in Kulturmedien von I21 und I25 wiedergefunden worden (Abb. B-8). Phenyllessigsäure und 1-Phenyl-1,2-ethandiol wurden in den Extrakten der anderen Bakterien als Hauptmetabolite analysiert. Phenylacetaldehyd, Methylphenylacetat, 2-Phenylethylacetat und 2-Hydroxy-1-phenylethanon konnten in geringeren Mengen identifiziert werden (Abb. B-9).



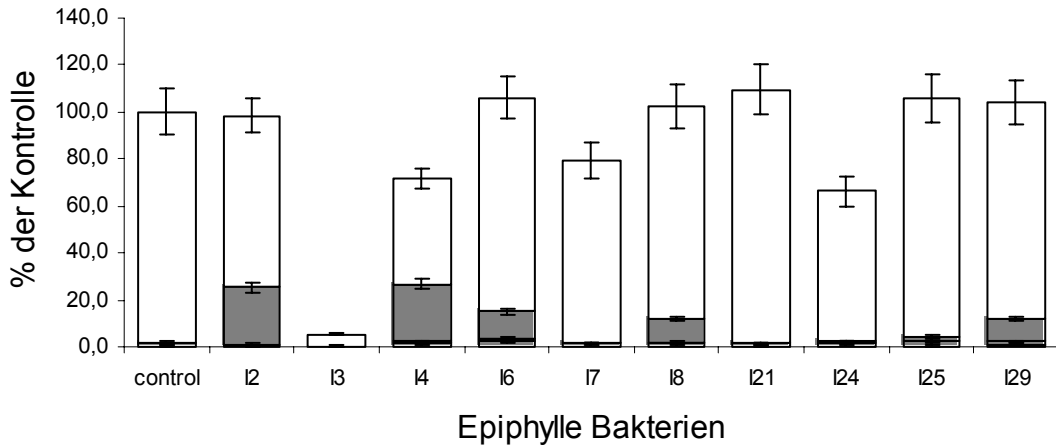
Obwohl die isolierten epiphyllen Bakterien R,S-Linalool, Nonanal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten konnten, waren sie jedoch in der Lage einige dieser Komponenten zu metabolisieren. Mit Ausnahme von R,S-Linalool konnte fast die Hälfte der epiphyllen Bakterien Nonanal zu diversen Produkten umwandeln (Abb. B-5), wobei erstmals ein Aldolkondensationsprodukt nachgewiesen wurde. Benzylalkohol und 2-Phenylethanol sind zum größten Teil zu ihren entsprechenden Säuren metabolisiert worden. Die Stämme I2, I3, I4, I24, I27 und I29 metabolisierten die Pflanzenstoffe effektiver als die Stämme I21 und I25.



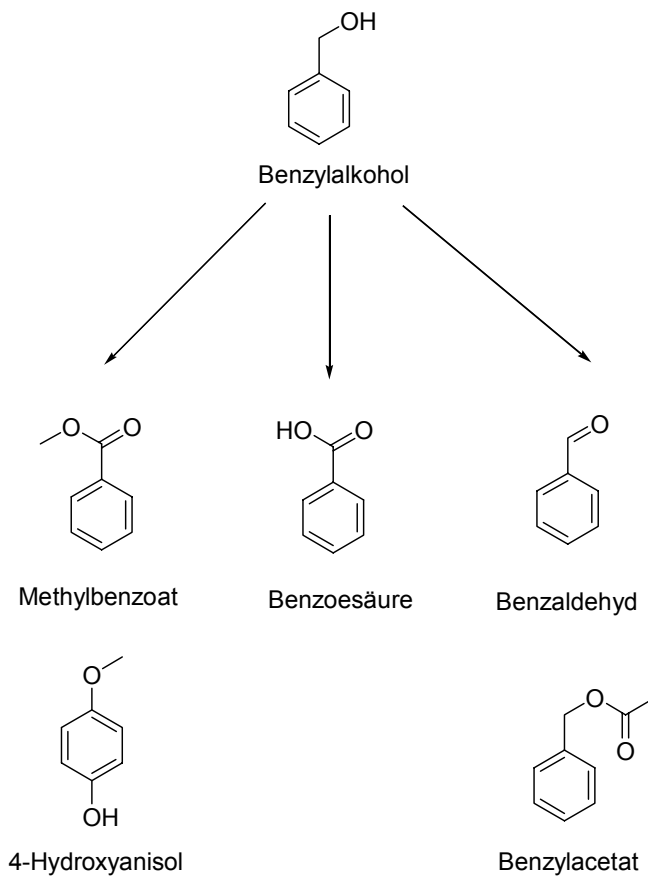
**Abb. B-4:** Metabolisierung von Nonanal durch epiphylle Bakterien. Nonanal (▧) wurde zu Nonansäure (□), 2-Heptyl-3-octylacrolein (▨), 1-Nonanol (▩) und anderen Metaboliten (■) umgesetzt.



**Abb. B-5:** Verbindungen, die bei der Metabolisierung von Nonanal durch epiphylle Bakterien gebildet und mittels GC-MS identifiziert wurden.

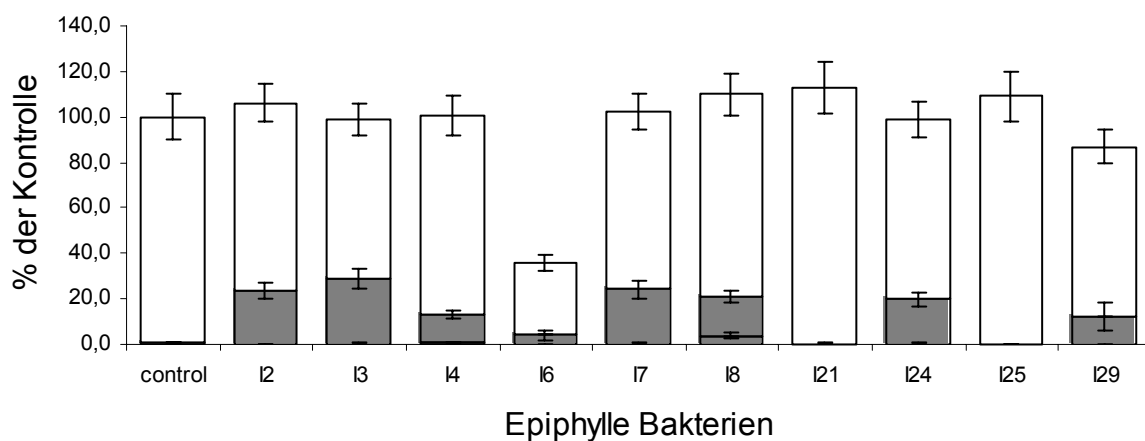


**Abb. B-6:** Metabolisierung von Benzylalkohol durch epiphyllie Bakterien. Benzylalkohol (□) wurde zu Benzoessäure (▨) Benzaldehyd (▧) und anderen Metaboliten (▩) umgesetzt.

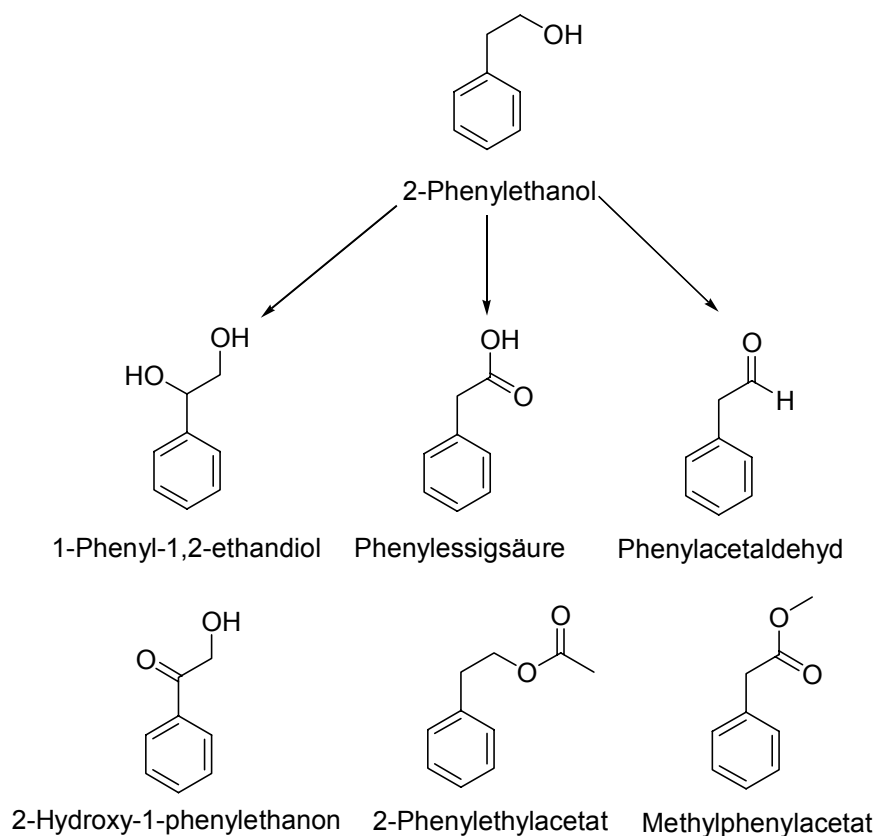


**Abb. B-7:** Verbindungen, die bei der Metabolisierung von Benzylalkohol durch epiphyllie Bakterien gebildet und mittels GC-MS identifiziert wurden.

## Ergebnisse & Diskussion



**Abb. B-8:** Metabolisierung von 2-Phenylethanol durch epiphyllie Bakterien. 2-Phenylethanol (□) wurde zu 1-Phenyl-1,2-ethandiol (▨), Phenylacetaldehyd (▩) und anderen Metaboliten (▧) umgesetzt.

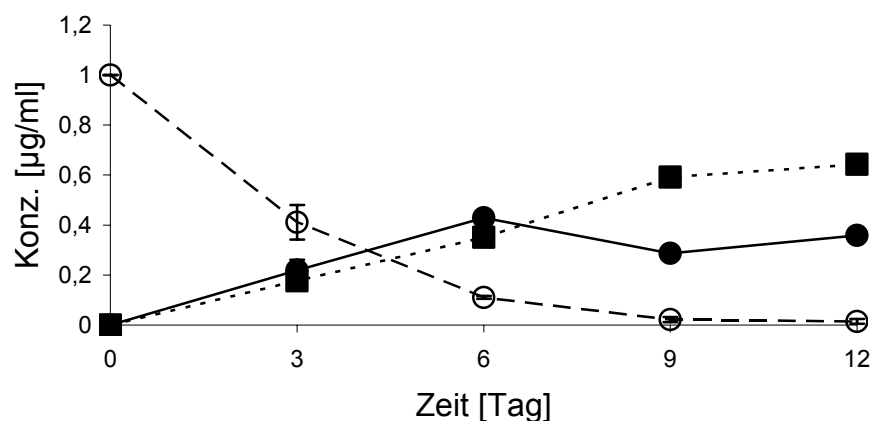


**Abb. B-9:** Verbindungen, die bei der Metabolisierung von 2-Phenylethanol durch epiphyllie Bakterien gebildet und mittels GC-MS identifiziert wurden.

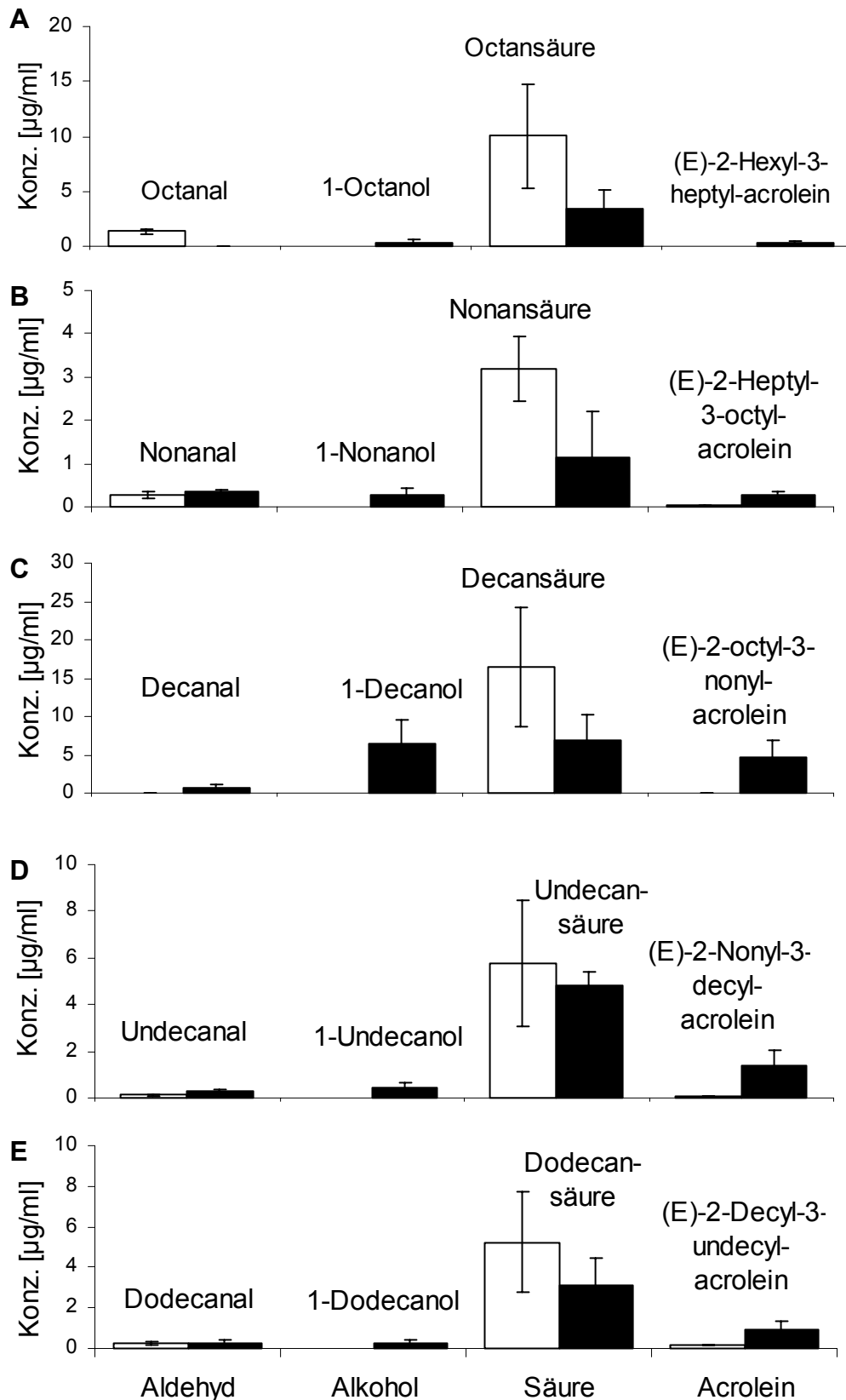
## 2.2 Biotransformation von C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> Aldehyden durch *Bacillus megaterium*

Bei den Metabolisierungsversuchen mit Nonanal wurde erstmals das Aldolkondensationsprodukt (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein bei den Stämmen I2, I3, I4, I24, I27 und I29 nachgewiesen. Das Isolat I29 zeigte hierbei die höchste Bildungsrate. Ein Zeitversuch mit Nonanal verdeutlichte, dass die höchste Konzentration an Aldolkondensationsprodukten nach sechs Tagen erreicht wurde. Im Gegensatz dazu stieg die Säurekonzentration kontinuierlich an (Abb. B-10). Folglich sind die Biotransformationen aliphatischer Aldehyde wie Octanal, Decanal, Undecanal und Dodecanal im Kulturmedium von *Bacillus megaterium* (I29) genauer untersucht worden.

Analog zu den Ergebnissen mit Nonanal, wurden Octanal, Decanal, Undecanal und Dodecanal durch den Bakterienstamm I29 zu den entsprechenden Alkoholen, Säuren und Aldolkondensationsprodukten umgesetzt (Abb. B-11). Säuren waren wie erwartet die Hauptkomponenten, während Alkohole und Aldolkondensationsprodukte auch in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden konnten. In Kontrollansätzen wurden die Säuren als Hauptkomponenten gebildet. Aldolkondensationsprodukte sind nur in vernachlässigbaren Mengen nachgewiesen worden. Alkohole entstanden jedoch nicht.



**Abb. B-10:** Verlauf der Biotransformation von Nonanal (○) zu (E)-2-Heptyl-3-octylacrolein (●) und Nonansäure (■) im Kulturmedium von *Bacillus megaterium* innerhalb von zwölf Tagen.

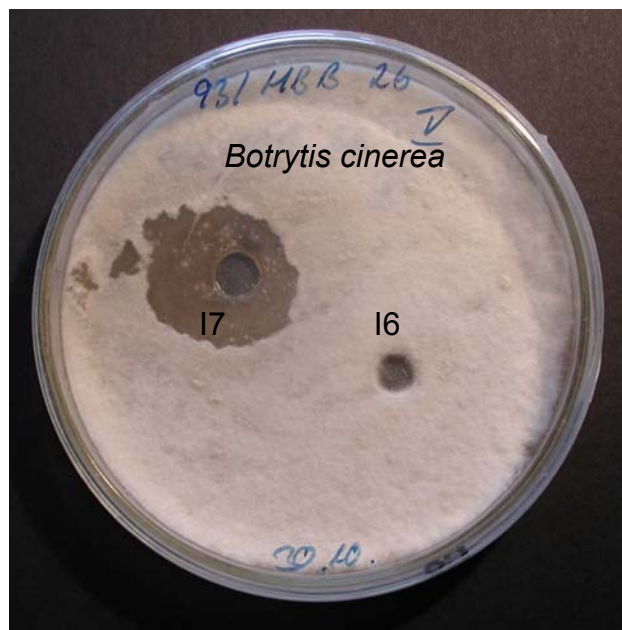


**Abb. B-11:** Hauptmetabolite der Biotransformationen von Octanal (A), Nonanal (B), Decanal (C), Undecanal (D) und Dodecanal (E) im Kulturmedium von *Bacillus megaterium* (■). Als Kontrolle (□) diente ein Ansatz ohne Bakterien.

### 2.3 Inhibierungsversuche von *Botrytis cinerea* durch epiphyllle Bakterien

Einen möglichen Vorteil, den epiphyllle Bakterien ihren Wirten liefern könnten, wäre der Schutz vor pflanzenpathogenen Keimen wie *Botrytis cinerea*. Die epiphyllen Bakterien sind deshalb *in vitro* im Hinblick auf das antagonistische Potential gegen verschiedene *Botrytis cinerea* Stämme geprüft worden. Die in Flüssigmedien kultivierten Bakterien wurden hierzu in Form von Kultursuspensionen bzw. Bakterienzellen (Pellet) auf Malzextrakt-Agarplatten (MEA), die vorher mit *Botrytis cinerea* inokuliert worden waren, in vorgestanzte Löcher einpipettiert.

Abbildung B-12 zeigt das Ergebnis eines Lochtests mit Kultursuspensionen der Stämme I6 und I7 auf einer mit *Botrytis cinerea* inokulierten MEA-Platte nach sieben Inkubationstagen. Als Maß für den Inhibierungseffekt wurde der Durchmesser der gebildeten Hemmhöfe gemessen.



**Abb. B-12:** Schematische Darstellung der Inhibierungswirkung der epiphyllen Bakterien I6 und I7 auf das Wachstum des pathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3). Während I7 eine Hemmwirkung zeigte, konnte I6 nicht wachsen.

Von den elf angesetzten Bakterienstämmen konnten mehr als die Hälfte das Mezylwachstum von *Botrytis cinerea* hemmen. Wie aus Tabelle B-3 hervorgeht, wiesen die Hemmhöfe Durchmesser zwischen 0,3 und 2,3 cm auf, wobei das Isolat I7 das höchste Inhibierungspotential zeigte.

**Tab. B-3:** Durchmesser der Inhibierungszonen, die bei der Wirkung epiphyller Bakterien auf das Wachstum des phytopathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3) gemessen wurden. Die Werte sind Mittelwerte von je sechs Versuchen. Standardabweichungen sind angegeben.

Epiphyllie Bakterien	Inhibierungszone [cm]
I2	1,4 ± 0,3
I3	1,8 ± 0,2
I4	-
I6	-
I7	2,0 ± 0,3
I8	1,3 ± 0,2
I21	-
I24	1,8 ± 0,2
I25	0,8 ± 0,2
I27	-
I29	0,2 ± 0,1

Weitere Versuche sollten die Frage klären, welchen Mechanismus die Bakterien benutzen, um das Wachstum von *Botrytis cinerea* zu hemmen. Dafür wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (4000 rpm, 25 min, 4 °C) gewonnen und mit Aceton und Glaskügelchen homogenisiert. Der letzte Schritt diente dazu die Bakterienzellen aufzubrechen, um mögliche Hemmstoffe freizusetzen. Nach Ankonzentrieren der Acetonlösung, wurden die Acetonextrakte erneut auf Malzextrakt-Agarplatten mit inokuliertem *Botrytis cinerea* in vorgestanzte Löcher einpipettiert. Zusätzlich wurden die Kulturüberstände steril filtriert und ihr inhibierendes Potential gegen den Pilz ebenfalls untersucht.

Im Gegensatz zu den ersten Ergebnissen, zeigten die sterilen Kulturfiltrate keine Hemmwirkung. Bei den Acetonextrakten hingegen konnte ein schwacher Inhibierungseffekt nur mit den Stämmen I3 und I7 beobachtet werden. Nach mikroskopischer Untersuchung stellte sich aber heraus, dass in den Acetonextrakten von I3 und I7 noch lebende Zellen vorhanden waren. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass der Inhibierungseffekt der epiphyllen Bakterien nicht durch

mögliche Inhibitoren hervorgerufen wird, sondern vermutlich durch Nährstoffkonkurrenz. Die epiphyllen Bakterien mit inhibierendem Potential konnten dem Pilz die Nährstoffe entziehen und dadurch dessen Wachstum verhindern.

#### **2.4 Wirkung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter auf das Wachstum von *Botrytis cinerea* und epiphyllen Bakterien**

Mehrere Untersuchungen beschrieben bereits den inhibierenden Effekt flüchtiger Blattkomponenten auf das Wachstum von pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen (Corre *et al.*, 1990; Lucchini *et al.*, 1990; Pattnaik *et al.*, 1997; Manohar *et al.*, 2001; Trombetta *et al.*, 2002). Folglich wurde die Wirkung der aus Blättern isolierten flüchtigen Komponenten Hexanal, (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, Linalool, Nonanal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol sowie (E)-2-Nonenal *in vitro* auf das Wachstum der epiphyllen Bakterien und den *Botrytis cinerea* Stämmen [B. c. 1: Nr. 23 (Bayer AG), B. c. 2: 92/RB 11, B. c. 3: 93/HRB 2b, und B. c. 4: 93/HRB 1b (Bayerische Landesanstalt)] untersucht. (E)-2-Nonenal wurde als zusätzliche Verbindung getestet, da sie auch durch Lipoxxygenase-Aktivität gebildet werden kann und ihre inhibierende Wirkung bereits dokumentiert ist (Hamilton-Kemp *et al.*, 1992; Campeol *et al.*, 2003). Hierzu wurden die Bakterienkolonien bzw. Myzelstücke in der Mitte, der mit verschiedenen Konzentrationen an flüchtigen Komponenten hergestellten MEA-Platten, in vorgestanzte Löcher gegeben. Nach sieben Tagen sind die Platten ausgewertet worden. Als Maß für die Wirkung der flüchtigen Verbindungen diente das Kolonien- bzw. Myzelwachstum der Bakterien und der Pilze.

Wie aus der Tabelle B-4 hervorgeht, beeinflusste die zunehmende Konzentration an (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, Linalool, Nonanal und (E)-2-Nonenal erwartungsgemäß das Wachstum der Mikroorganismen sehr stark. Das Wachstum der *Botrytis cinerea* Stämme nahm bereits in Gegenwart der meisten Verbindungen bei Konzentrationen von 1 ppm ab und wurde bei 100 ppm komplett gehemmt. Als besonders wirksam gegen die Pilze erwiesen sich Nonanal und (E)-2-Nonenal. Nonanal verminderte das Myzelwachstum bereits bei 1 ppm und verhinderten bei 10 ppm das Wachstum vollständig. Die Isolate I3, I4, I8, I24 und I29 konnten sich



dagegen bei höheren Konzentrationen zwischen 100 ppm Linalool, Nonanal und (E)-Nonenal und 1000 ppm Linalool noch vermehren. Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Hexanal, (Z)-3-Hexenal und (E)-2-Hexenal inhibierten ab 100 ppm das Wachstum aller Mikroorganismen. Es zeigte sich, dass einige der isolierten epiphyllen Bakterien die eingesetzten flüchtigen Verbindungen besser vertragen konnten als *Botrytis cinerea*. Viele der nicht-pathogenen epiphyllen Bakterien waren somit besser an diese natürlichen Pflanzenstoffe angepasst als der pflanzenpathogene Pilz *Botrytis cinerea*.

**Tab. B-4:** Wirkung flüchtiger Verbindungen der Erdbeerblätter [Hexanal, (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, R,S-Linalool, Nonanal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol] sowie (E)-2-Nonenal auf das Wachstum von *Botrytis cinerea* Stämmen [B .c. 1: Nr. 23 (Bayer AG), B. c. 2: 92/RB 11, B. c. 3: 93/HRB 2b (Bayerische Landesanstalt)] und den epiphyllen Bakterien I3, I4, I7, I8, I24, I25, I29. Die Kolonien- bzw. Myzelradien wurden nach sieben Tagen ermittelt. Standardabweichungen sind angegeben.

Verbindung	MO <sup>a</sup>	Kolonienradius [cm] auf MEA-Platten mit Konz. von:				
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
R,S-Linalool	B. c. 1	3,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0	0
	B. c. 2	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3	0	0
	B. c. 3	3,7 ± 0,4	3,2 ± 0,4	1,6 ± 0,5	0	0
	I3	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	I4	3,2 ± 0,5	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0
	I7	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0	0
	I8	3,1 ± 0,5	3,4 ± 1,1	1,8 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0
	I24	3,1 ± 0,8	3,3 ± 0,3	1,2 ± 0,8	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	I25	2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0	0
	I29	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Nonanal	B. c. 1	3,6 ± 0,1	2,3 ± 0,1	0	0	0
	B. c. 2	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2	0	0	0
	B. c. 3	3,7 ± 0,3	4,1 ± 0,2	0	0	0
	I3	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	0

Ergebnisse & Diskussion

Fortsetzung Tab. B-4

	I4	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,3	0	0
	I7	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0	0	0
	I8	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0
	I24	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	2,3 ± 0,3	0
	I25	2,5 ± 0,1	0	0	0	0
	I29	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	1,7 ± 0,4	0
Benzylalkohol	B. c. 1	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0	0
	B. c. 2	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1	0	0
	B. c. 3	3,8 ± 0,3	4,0 ± 0,3	3,4 ± 0,2	0	0
	I3	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	0	0
	I4	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0	0
	I7	1,4 ± 0,3	2,4 ± 0,6	1,6 ± 0,3	0	0
	I8	8,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0	0
	I24	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0	0	0
	I25	2,5 ± 0,2	0	0	0	0
	I29	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0	0
2-Phenylethanol	B. c. 1	3,7 ± 0,1	1,7 ± 0,3	0	0	0
	B. c. 2	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2	2,0 ± 0,3	0	0
	B. c. 3	3,8 ± 0,3	4,1 ± 0,6	2,6 ± 0,1	0	0
	I3	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	0	0
	I4	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,2 ± 0,1	0	0
	I7	1,7 ± 0,6	2,6 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0	0
	I8	4,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,3 ± 0,7	0	0
	I24	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	0	0
	I25	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0	0
	I29	4,2 ± 0,1	4,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	0	0
Hexanal	B. c. 1	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0	
	B. c. 2	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0	
	I3	2,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0	
	I4	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,0	1,5 ± 0,2	0	
	I8	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0	

Fortsetzung Tab. B-4

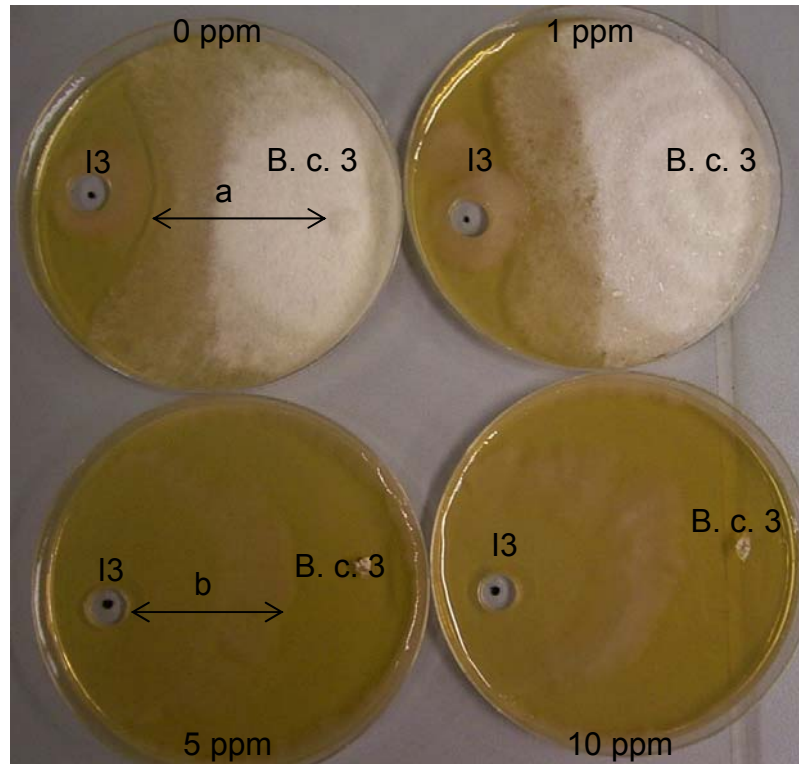
	I29	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,1	0
(Z)-3-Hexenal	B. c. 1	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	1,9 ± 0,1	0
	B. c. 2	4,2 ± 0,0	3,2 ± 0,0	1,5 ± 0,2	0
	I3	2,7 ± 0,3	1,5 ± 0,0	1,2 ± 0,3	0
	I4	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0	0
	I8	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0
(E)-2-Hexenal	I29	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0	0
	B. c. 1	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	3,1 ± 0,2	0
	B. c. 2	4,2 ± 0,0	2,8 ± 0,0	2,1 ± 0,1	0
	I3	2,7 ± 0,3	1,7 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0
	I4	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0
	I8	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0
(E)-2-Nonenal	I29	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0
	B. c. 1	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0	0
	B. c. 2	4,2 ± 0,0	4,2 ± 0,0	0	0
	I3	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,7	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,0
	I4	2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0
	I8	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0
	I29	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,0	0,6 ± 0,1

<sup>a</sup> Mikroorganismen

## 2.5 Inhibierung von *Botrytis cinerea* durch epiphyllie Bakterien in Gegenwart flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter

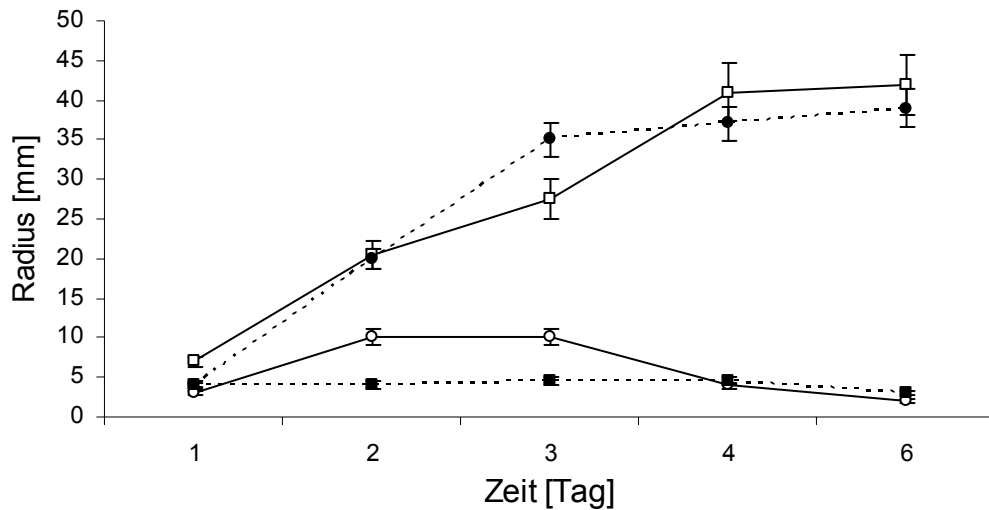
Ein Einfluss flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter sowohl auf das Wachstum epiphyller Bakterien als auch auf das Wachstum von *Botrytis cinerea* Stämmen konnte im vorherigen Versuch festgestellt werden. Hierbei konnten sich einige epiphyllie Bakterien in Gegenwart hoher Konzentrationen an flüchtigen Verbindungen besser vermehren als die *Botrytis cinerea* Stämme (Abschnitt B-2.4). Folglich wurden Co-Kultivierungsexperimente durchgeführt, um die synergetische Hemmung der Bakterien und der flüchtigen Komponenten gegenüber dem Pilz zu testen. Hierzu sind epiphyllie Bakterien und *Botrytis cinerea* Stämme gemeinsam auf MEA-Platten in

Gegenwart flüchtiger Verbindungen inkubiert worden. Nach etwa sieben Tagen wurden die gebildeten Kolonie- bzw. Myzelradien, wie in der Abbildung B-13 dargestellt ist, gemessen.

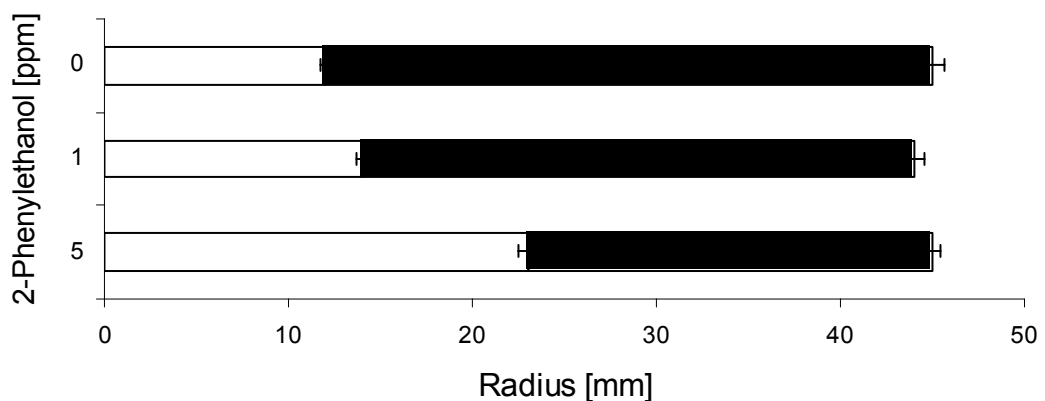


**Abbildung B-13:** Co-Kultivierungsexperimente: Inkubation von I3 mit *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3) auf MEA-Platten in Gegenwart von 1, 5 und 10 ppm (E)-2-Nonenal. 0 ppm diente als Kontrolle. Nach sieben Tagen wurden die gebildete Myzel- (a) bzw. Kolonieradien (b) gemessen.

Auf MEA-Platten ohne Nonanal wurde das Isolat I3 schon nach vier Tagen durch den *Botrytis cinerea* Stamm Nr. 23 (B. c. 1) komplett überwachsen. In Gegenwart von 1 ppm Nonanal zeigte sich aber eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums, wobei I3 sich besser vermehren und sogar das Myzel nach sechs Tagen überwachsen konnte (Abb. B-14). 2-Phenylethanol lieferte ein ähnliches Ergebnis. Bereits bei 1 und 5 ppm wurde das Wachstum von *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3) stark gehemmt, zugunsten der Vermehrung von I3 (Abb. B-15).



**Abbildung B-14:** Einfluss von Nonanal auf das Wachstum von I3 und *Botrytis cinerea* Stamm Nr. 23 (B .c. 1, Bayer AG). Die Radien der Bakterienkolonien und des Myzels wurden täglich gemessen. Ohne Nonanal konnte der Pilz (-□-) schneller als das Isolat I3 (-■-) wachsen und dessen Kolonie sogar nach vier Tagen überwachsen. Bei 1 ppm Nonanal wurde das Wachstum des Pilzes (-○-) stark gehemmt, während I3 (-●-) besser wachsen und nach sechs Tagen das Myzel überwachsen konnte.



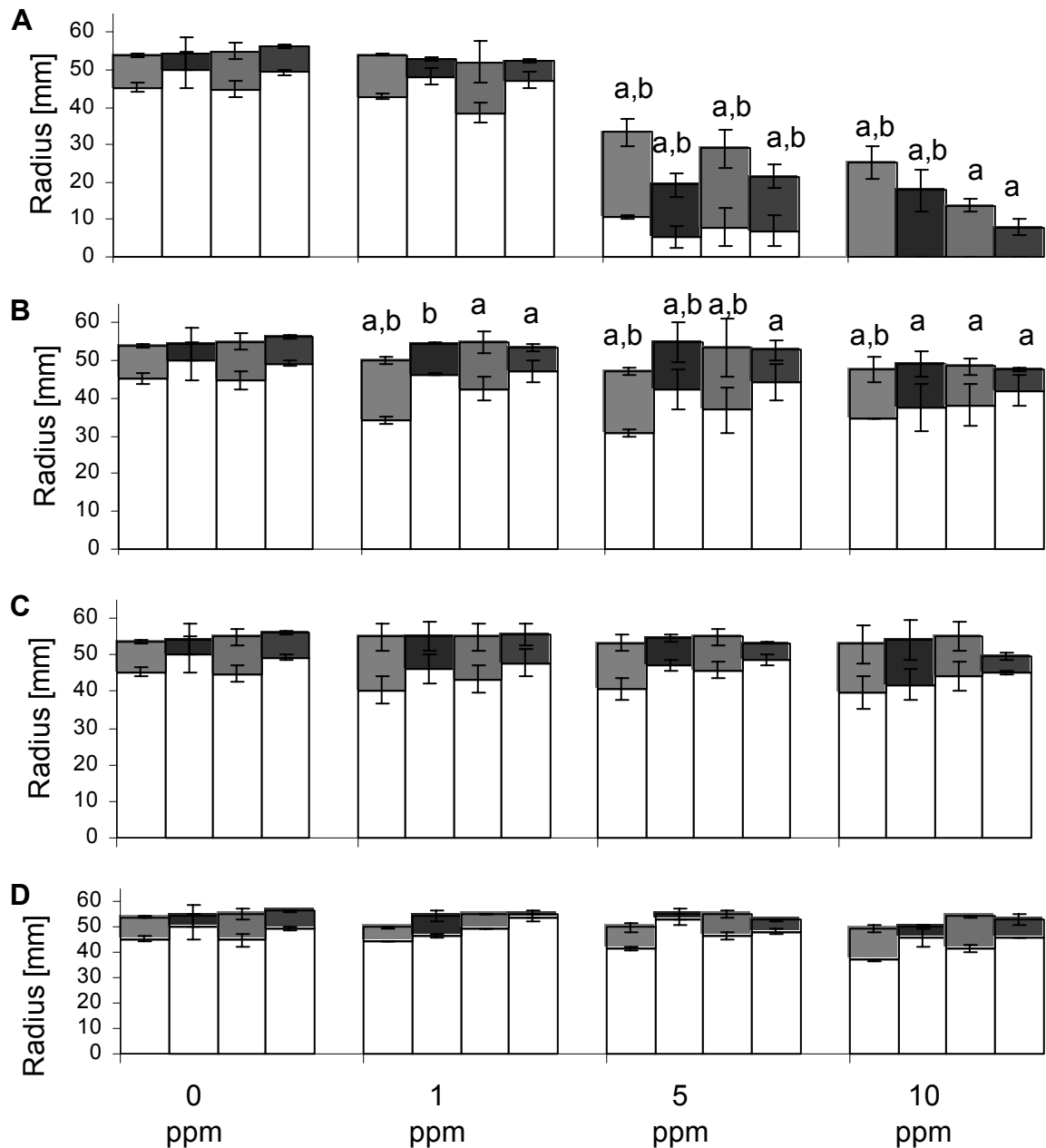
**Abbildung B-15:** Einfluss von 2-Phenylethanol auf das Wachstum von I3 (-□-) und *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (-■-) (B. c. 3, Bayerische Landesanstalt). Die jeweiligen Radien wurden nach der Berührung von der Kolonie und dem Myzel gemessen.

Die Ergebnisse der Co-Kultivierungsexperimente mit weiteren epiphyllen Bakterien und *Botrytis cinerea* Stämmen in Gegenwart flüchtiger Verbindungen sind in Abbildungen B-16 bis B-18 dargestellt. Bei den Versuchen ohne flüchtige Komponenten in MEA konnten die Pilzstämmen schneller wachsen als die epiphyllen

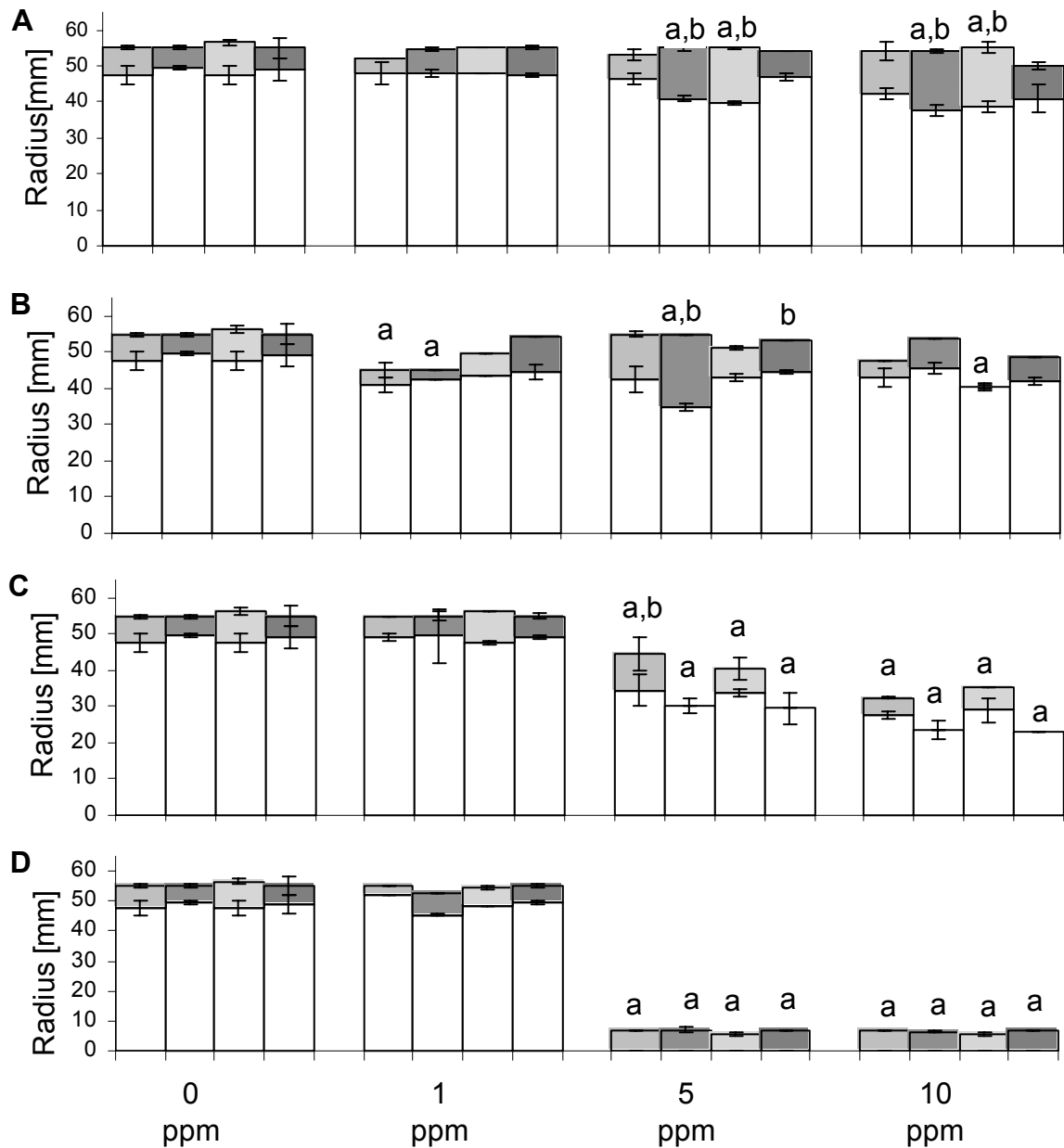
Bakterien. Bereits bei niedrigen Konzentrationen der flüchtigen Komponenten wurde jedoch das Wachstum der Pilze stärker gehemmt als das der epiphyllen Bakterien. Bei höheren Konzentrationen konnte sogar eine verstärkte Proliferation der Bakterienstämme festgestellt werden. (E)-2-Hexenal zeigte bereits bei 1 ppm eine Hemmwirkung auf das Myzelwachstum des Pilzstammes *Botrytis cinerea* 93/HRB 1b (B. c. 4) (Abb. B-18C). Eine starke Verminderung des Pilzwachstums konnte mit 5 ppm (E)-2-Nonenal und Nonanal beobachtet werden (Abb. B-16A, B-17D, B-18D). Untersuchungen mit 10 ppm (E)-2-Nonenal und Nonanal zeigten sogar, dass diese Konzentrationen das Myzelwachstum komplett inhibierten. Diese Verbindungen wiesen andererseits eine deutlich fördernde Wirkung auf das Wachstum von mehr als der Hälfte der epiphyllen Bakterien auf. Der Hemmeffekt von (Z)-3-Hexenal, Hexanal, R,S-Linalool und Benzylalkohol auf das Wachstum der eingesetzten Pilzstämme und die Wachstumsförderung der epiphyllen Bakterien war geringer, jedoch noch statistisch signifikant.

Die vier verwendeten *Botrytis cinerea* Stämme [B. c. 1: Nr. 23 (Bayer AG), B. c. 2: 92/RB 11, B. c. 3: 93/HRB 2b, und B. c. 4: 93/HRB 1b (Bayerische Landesanstalt)] zeigten eine nahezu ähnliche Sensibilität gegenüber den flüchtigen Verbindungen, obwohl sie von unterschiedlichen Pflanzen isoliert worden waren. Die Stämme B. c. 2, B. c. 3 und B. c. 4 stammen von Rebenblättern, während B. c. 1 von Erdbeerblättern gewonnen wurde.

Es lässt sich zusammenfassen, dass einige der epiphyllen Bakterien in der Lage waren, die flüchtigen Verbindungen, die die Vermehrung der pathogenen *Botrytis cinerea* Stämme inhibierten, zugunsten ihres Wachstums zu nutzen.

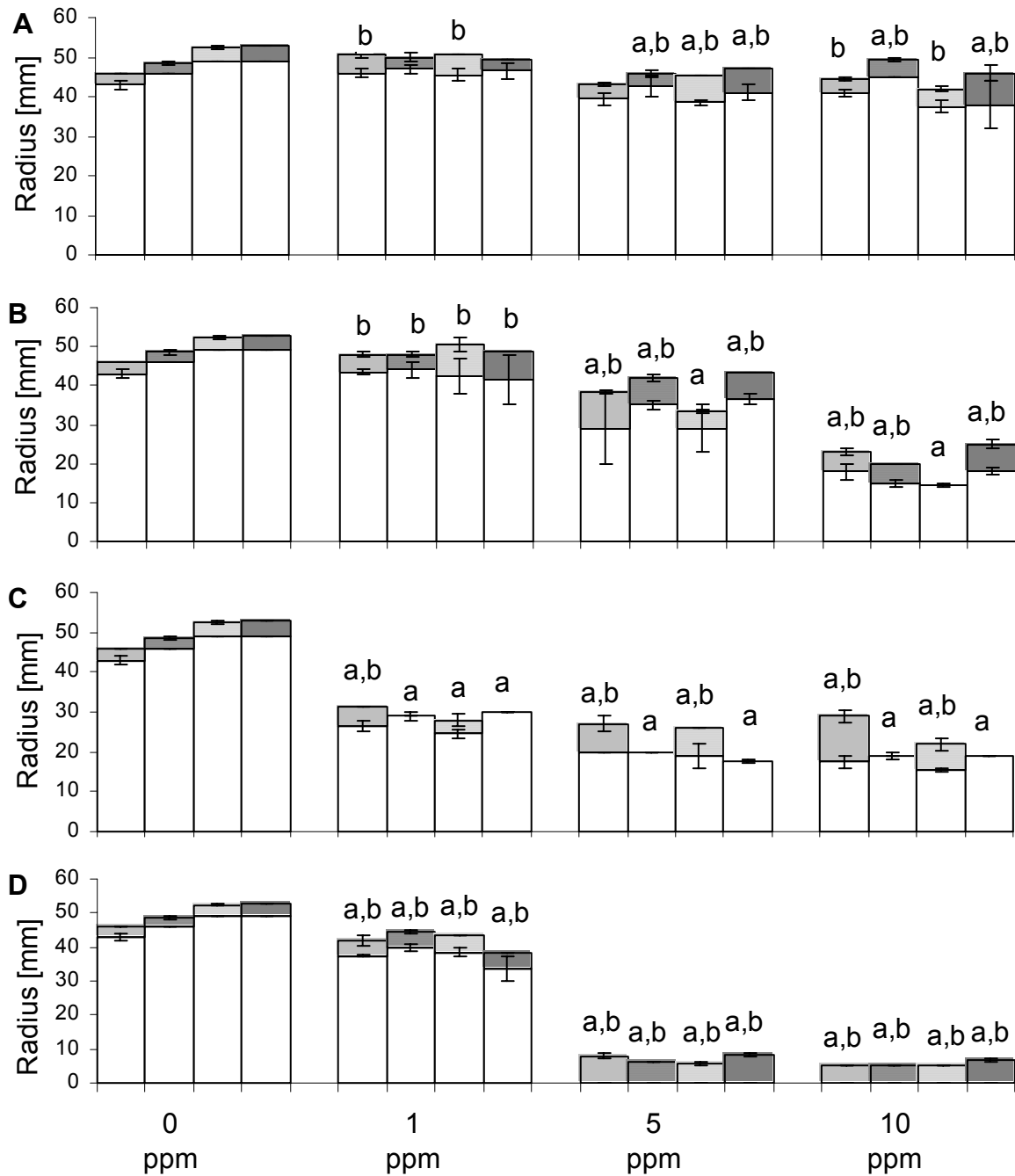


**Abbildung B-16:** Einfluss von Nonanal (A), R,S-Linalool (B), Benzylalkohol (C) und 2-Phenylethanol (D) auf das Wachstumsverhalten von epiphyllen Bakterien I3 (□), I6 (▤), I8 (▥) and I24 (▧) in Gegenwart des pathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3, Bayerische Landesanstalt) (□). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach dem T-TEST ( $p < 0,05$ ). Das Wachstum von *Botrytis cinerea* 93/HRB 2b (B. c. 3) nimmt ab (a). Das Wachstum der epiphyllen Bakterien nimmt zu (b).



**Abbildung B-17:** Einfluss von Hexanal (A), (Z)-3-Hexenal (B), (E)-2-Hexenal (C) und (E)-2-Nonenal (D) auf das Wachstumsverhalten von epiphyllen Bakterien I3 (▣), I4 (▤), I8 (▥) and I24 (▧) in Gegenwart des pathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* 93/RB 11 (B. c. 2, Bayerische Landesanstalt) (□). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach dem T-TEST ( $p < 0,05$ ). Das Wachstum von *Botrytis cinerea* 93/RB 11 (B. c. 2) nimmt ab (a). Das Wachstum der epiphyllen Bakterien nimmt zu (b).





**Abbildung B-18:** Einfluss von Hexanal (A), (Z)-3-Hexenal (B), (E)-2-Hexenal (C) und (E)-2-Nonenal (D) auf das Wachstumsverhalten von epiphyllen Bakterien I3 (□), I4 (▨), I8 (▩) and I24 (▧) in Gegenwart des pathogenen Pilzes *Botrytis cinerea* 93/HRB 1b (B. c. 4, Bayerische Landesanstalt) (□). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach dem T-TEST ( $p < 0,05$ ). Das Wachstum von *Botrytis cinerea* 93/HRB 1b (B. c. 4) nimmt ab (a). Das Wachstum der epiphyllen Bakterien nimmt zu (b).

## 2.6 Diskussion der Ergebnisse

Obwohl die isolierten epiphyllen Bakterien die Erdbeerblattkomponenten Hexanal, (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, R,S-Linalool, Nonanal, (E)-2-Nonenal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten konnten, waren sie dennoch in der Lage diese flüchtigen Komponenten mehr oder weniger zu metabolisieren. Mit Ausnahme von R,S-Linalool und Hexanal wurden jeweils die entsprechenden Säuren als Hauptmetabolite gebildet. Einige Bakterien waren in der Lage Nonanal zu einer unbekanntem Verbindung umzusetzen, welche erstmals als Produkt der Aldolkondensation zweier Nonanal Moleküle identifiziert wurde.

Die Aldolkondensation ist eine wichtige chemische Reaktion, die unter basischen Bedingungen abläuft. Die synthetische Nutzung dieser Reaktion liegt darin, dass eine neue C-C Bindung gebildet wird, wobei entweder eine Hydroxycarbonylgruppierung oder  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung entsteht (Van De Water *et al.*, 2000). Die erzielten Ergebnisse der Biotransformationen von Aldehyden (Abschnitt B-2.2) zeigten, dass die gebildeten Aldolkondensationsprodukte nicht chemisch entstanden, sondern auf eine enzymatische Reaktion zurückzuführen sind.

Im Allgemeinen treten auch in natürlichen Systemen Aldolkondensationen auf. Zum Beispiel werden Kollagenfasern durch chemische Vernetzung von Aldehydgruppen durch Aldolkondensationen verstärkt (Eyre, 1987). Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Faserprotein in Säugetieren. Es ist die überwiegende faserige Komponente von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel und Zähnen. Aldolkondensationsprodukte wurden außerdem als natürliche Verbindungen im Orangenschalenöl (Moshonas und Lund, 1969), als flüchtige Komponenten von grünen und reifen Ananas (Katsumi *et al.*, 1992) und als Bestandteile von Alarmpheromonen bei Ameisen (Bradshaw *et al.*, 1979; Rossi *et al.*, 1992) beschrieben. Die Bildung dieser natürlichen Aldolkondensationsprodukte wurde jedoch nicht untersucht. Eine mögliche Bildung durch Mikroorganismen wäre aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse denkbar. Des Weiteren wurde über die Biotransformation von Aldehyden berichtet (Simmonds und Robinson, 1998; Hook *et al.*, 1999; Hylemon *et al.*, 1999; Shimoni *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2002). Bisher ist jedoch die Bildung von Aldolkondensationsprodukten durch Mikroorganismen nicht beschrieben worden. Somit wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Aldolkondensation von

Pflanzenaldehyden durch Bakterienstämme nachgewiesen. Obwohl der genaue Mechanismus der Bildung dieser Verbindungen ungeklärt bleibt, kann ausgehend von den hier erzielten Ergebnissen angenommen werden, dass die Mikroorganismen bei der Bildung natürlicher Aldolkondensationsprodukte eine Rolle spielen.

Versuche mit dem pflanzenpathogen Pilz *Botrytis cinerea* zeigten, dass die epiphyllen Bakterien und der Pilz um die Nährstoffe auf der Blattoberfläche konkurrieren, wobei einige Epiphyllen aufgrund ihres schnellen Wachstums die Vermehrung des Pilzes unterdrücken. Die Konkurrenz um die Nährstoffe bei epiphyllen Mikroorganismen in der Phyllosphäre ist bekannt (Wilson und Lindow, 1994) und der antagonistische Effekt durch die Freisetzung antimikrobieller Substanzen scheint auch anderen Autoren wenig wahrscheinlich (Lindow und Brandl, 2003). Der in dieser Arbeit beobachtete inhibierende Effekt der Epiphyllen auf das Wachstum von *Botrytis cinerea* ist somit vermutlich nicht durch mögliche Inhibitoren hervorgerufen worden, sondern durch Nährstoffentzug.

Durch Inhibierungsexperimente konnte außerdem die Sensibilität der Bakterienarten und der Pilzstämme gegenüber den flüchtigen Komponenten der Blätter demonstriert werden. Bei den Versuchen mit (Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal, R,S-Linalool, Nonanal, (E)-2-Nonenal und 2-Phenylethanol zeigte sich, dass das Wachstum von *Botrytis cinerea* bereits bei Konzentrationen gehemmt wurde, die um eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die Gehalte bei denen die Epiphyllen geschädigt wurden. Unter natürlichen Bedingungen werden die flüchtigen Verbindungen aus den Blättern in Konzentrationen von 100 oder 1000 ppm sicherlich nicht ausgeschieden. Rajaonarivony und Mitarbeiter (1992) hatten herausgefunden, dass aus einem Kilogramm frischer Pfefferminzblätter (*Mentha x piperita*) etwa 0,15 mg Linalool und 0,45 mg Benzylalkohol entstehen. Wenn man aber annimmt, dass flüchtige Verbindungen auf den Blattoberflächen nicht gleichmäßig verteilt sind - R,S-Linalool und Nonanal werden hauptsächlich aus den Drüsenhaaren freigesetzt - dann sind die Konzentrationen dieser Verbindungen in der Umgebung der Drüsenhaare höher als die über das ganze Blatt gemittelten Mengen. Daher ist eine lokal erhöhte Konzentration an flüchtigen Komponenten nicht auszuschließen. Ein in diesen Untersuchungen zu berücksichtigender Aspekt ist zudem die Fähigkeit einiger epiphyller Bakterien flüchtige Pflanzenverbindungen metabolisieren zu können. Die

neu gebildeten Metabolite, wie zum Beispiel Benzoessäure aus Benzylalkohol oder Nonansäure aus Nonanal, hemmen sowohl die Proliferation von Hefen und Pilzen als auch von Bakterien (Lattanzio *et al.*, 1994). Die Pflanzen könnten somit durch diese neuen Verbindungen ihre Hemmeffekte gegenüber den pathogenen Pilzen wie *Botrytis cinerea* verstärken. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Nahrungsentzug durch epiphyllie Bakterien und die Wirkung von flüchtigen Komponenten einen additiven oder synergetischen Inhibierungseffekt auf das Wachstum des Pilzes *Botrytis cinerea* ausüben. Folglich wurden Co-Kultivierungsexperimente *in vitro* durchgeführt, bei denen epiphyllie Bakterien zusammen mit *Botrytis cinerea* Stämmen auf MEA-Platten in Gegenwart verschiedener flüchtiger Pflanzenmetabolite inkubiert wurden. Bei den Experimenten mit (E)-2-Hexenal, Nonanal, (E)-2-Nonenal, 2-Phenylethanol und R,S-Linalool konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Epiphyllen geringer gehemmt wurde als die der Pilzstämme. In einigen Fällen konnte sogar ein verstärktes Wachstum der epiphyllen Bakterien registriert werden. Bereits bei Konzentrationen um 1 ppm wurde die Vermehrung der Pilzstämme inhibiert, während die Epiphyllen weiterhin wachsen konnten. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass epiphyllie Bakterien flüchtige Pflanzenmetabolite zu ihrem Vorteil verwerten können. Vielen Berichten zufolge ist der Kampf um Nährstoffe zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen entscheidend für den Mechanismus der Biokontrolle in der Phyllosphäre. Da viele nicht-pathogenen Mikroorganismen die Kohlenstoff- und Energiequellen (Kohlenhydrate, Aminosäure) auf Blättern bzw. Früchten effektiv nutzen können, werden sie oft als Antagonisten gegen pathogene Mikroorganismen eingesetzt. Flüchtige Pflanzenmetabolite wurden als Nährstoffquelle bis jetzt kaum berücksichtigt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die flüchtigen Pflanzenkomponenten als Kohlenstoff- und Energiequelle von einigen epiphyllen Bakterien verwertet werden, wodurch das Wachstum von pathogenen Pilzen wie *Botrytis cinerea* gehemmt werden kann.

### 3 Interaktionen von methylo-trophen Bakterien mit Pflanzen

#### 3.1 Methylo-trophe Bakterien

Als methylo-trophe Bakterien bezeichnet man eine Gruppe aerober Mikroorganismen, die obligat oder fakultativ C<sub>1</sub>-Verbindungen als Substrate zum Wachstum verwenden. Methylo-trophen sind in der Natur weit verbreitet und werden vor allem auf Blättern gefunden, wo sie bis zu 80 % der hetero-trophen Bakterienpopulation ausmachen können (Holland und Polacco, 1994). Auch im Bereich der Rhizoder-mis ließen sich Methylo-trophen nachweisen (Sy *et al.*, 2001).

Die ersten Hinweise auf methylo-trophe Bakterien lieferte Loew im Jahr 1892 (Goldberg und Rokem, 1991). Er isolierte einen Mikroorganismus, der in der Lage war C<sub>1</sub>-Verbindungen wie Methan oder Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, und nannte ihn *Bacillus methylicus*. Im Jahr 1906 isolierte Söhngen ein Bakterium, *Bacillus methanicus*, das Methan als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten konnte (Goldberg und Rokem, 1991). Söhngen war aber nur an Mikroorganismen interessiert, die hauptsächlich Kohlenhydrate als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzten und *Bacillus methanicus* wurde deshalb in seinen Studien nicht weiter berücksichtigt. Etwa 70 Jahre nach Loew, gelangen Peel und Quayle (1961) einen ähnlichen Stamm zu isolieren und ordneten ihn der Gattung *Pseudomonas* AM1 zu.

Ab den sechziger Jahren wurden den methylo-trophen Bakterien, aufgrund ihrer Fähigkeit C<sub>1</sub>-Verbindungen zu nutzen, größeres Interesse geschenkt. 1970 veröffentlichten Whittenbury und Mitarbeiter Ergebnisse ihrer Arbeiten, in denen sie verschiedene Methoden zur Isolierung methylo-tropher Bakterien darlegten. Dabei wurden mehr als 100 Stämme isoliert, die Methan oder Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnten. Ausgehend von diesen Experimenten wurden die physiologischen und morphologischen Eigenschaften weiterer Methylo-trophen untersucht (Holland und Polacco, 1994; Bourque *et al.*, 1995; Ivanova *et al.*, 2000). Zahlreiche Arbeiten zur Aufklärung der Assimilation von C<sub>1</sub>-Verbindungen durch die Methylo-trophen lieferten eine Fülle von neuen

Stoffwechselwegen, wobei der Serin-Stoffwechsel vollständig aufgeklärt wurde (Anthony, 1982).

Eine der treibenden Kräfte bei den Arbeiten mit den Methylo-trophen war die Erkenntnis, dass diese Mikroorganismen eine wirtschaftliche Bedeutung besitzen könnten. Mit Hilfe der Methylo-trophen sollten aus billigem Methan oder Methanol kostengünstige Proteine, die so genannten „single cell proteins“, produziert werden. Außerdem wurde daran gedacht, angesichts der breiten Anwendbarkeit des Enzyms Methanoxygenase, welches die Methylo-trophen produzieren, diese Bakterien bei einer Reihe spezifischer organischer Transformationen zu verwenden. Während sich in den siebziger Jahren die Technologie um das Nutzen der Methylo-trophen und die daraus hergestellten „single cell proteins“ höherer Qualität bekannt als „Pruteen“ entwickelte, war der wirtschaftliche Prozess jedoch nicht wettbewerbsfähig (Goldberg und Rokem, 1991). Seither beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen nur noch mit der Rolle von Methylo-trophen bei Interaktionen mit Pflanzen.

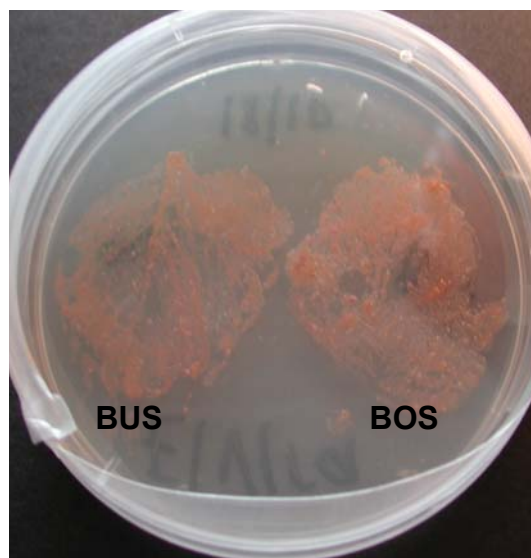
Im Jahr 1997 stellte Holland die These auf, dass Methylo-trophen in einer symbiotischen Beziehung mit der Pflanze das von den Pflanzen ausgeschiedene toxische Nebenprodukt Methanol für den eigenen Stoffwechsel verwerten. Holland konkretisierte seine These sogar noch weiter, in dem er postulierte, dass die Methylo-trophen das für Wachstumsvorgänge wichtige Pflanzenhormon Cytokinin für die Pflanzen erzeugen. Wurde eine Pflanze vollständig von Methylo-trophen befreit, konnte eine Hemmung normaler Differenzierungsvorgänge beobachtet werden. Auch die Tatsache, dass in dieser Zeit noch keine pflanzliche Cytokinin-Synthase isoliert worden war, schien dafür zu sprechen. Die zum Teil umstrittene Theorie bezüglich der Cytokinin-Synthase wurde aber einige Jahre später korrigiert. Das Gen für die Cytokinin-Synthase wurde sowohl in *Zea mays* (Morris *et al.*, 1999) als auch in *Arabidopsis thaliana* (Takei *et al.*, 2001) gefunden. Es ist aber in weiteren Studien gezeigt worden, dass Methylo-trophen nicht nur Cytokinine bilden, sondern auch andere Phytohormone, wie Auxine (Ivanova *et al.*, 2000; Doronina *et al.*, 2002) synthetisieren. Kalyaeva und Mitarbeiter (2001) zeigten außerdem, dass Methylo-trophen das Wachstum einiger Pflanzen *in vitro* fördern.

Ausgehend von den oben beschriebenen Eigenschaften der Methyloleptiden in Pflanzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung der Methyloleptiden auf einige Nutzpflanzen untersucht. Dazu sind reine Methyloleptiden von Erdbeerblättern isoliert worden, welche anschließend für Untersuchungen bei der Keimung von verschiedenen Samenarten verwendet wurden.

### 3.2 Isolierung und Charakterisierung von Methyloleptiden aus Erdbeerblättern

Für die Isolierung methyloleptischer Mikroorganismen wurden sowohl die Blattober- als auch unterseiten von Erdbeerblättern auf M9-Methanol-Agarplatten, einem selektiven Medium für Methyloleptiden, abgedrückt und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Kolonien der Methyloleptiden der Erdbeerblattabdrücke sind in Abbildung B-19 dargestellt. Die Methyloleptiden konnten von beiden Blattseiten isoliert werden. Die Mikroorganismen siedelten auf der Blattunterseite bevorzugt an den Blattadern an, während sie auf der Blattoberseite homogen verteilt waren. Von diesen Kolonien wurden vier Reinkulturen vereinzelt, die anschließend für die weitere taxonomische Einordnung untersucht wurden.



**Abb. B-19:** Abdrücke vom Erdbeerblatt auf M9-Methanol-Agarplatte: Blattunterseite (BUS) und Blattoberseite (BOS).

Zur Identifizierung der isolierten Reinkulturen wurde eine phylogenetische Charakterisierung vom Arbeitskreis Frau Dr. Hentschel, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, durchgeführt. Diese basierte auf der partiellen Sequenzierung des ribosomalen 16S rRNA-Gens. Dabei wurden die Fragmente der DNA unter Verwendung von unspezifischen Primern mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Diese Fragmente sind anschließend mit der sog. Taqcycle DyeDeoxy<sup>TM</sup> Terminator-Methode sequenziert worden. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit Einträgen in der EMBL (European Molecular Biology Laboratory)-Datenbank verglichen. Wie aus Tabelle B-5 hervorgeht, ergab die partielle Sequenzierung der 16S rRNAs jeweils eine Ähnlichkeit von 99,8 bis zu 100 % zum Typ-Stamm von *Methylobacterium extorquens*. Die in Tabelle B-6 dargestellten physiologischen Tests bestätigten dieses Ergebnis.

**Tab. B-5:** Einordnung der anhand der partiellen 16S rRNA Sequenzen identifizierten methylo-trophen Stämme und die Ergebnisse deren Analyse mit BLAST<sup>a</sup>. Die Identität mit dem besten Treffer (in Prozent) ist angegeben. Der Code in eckigen Klammern deutet auf die Datenbanknummer in EMBL<sup>b</sup> hin.

Methylotrophe	Bester Treffer	Identität in %
ME1 [AJ223453]	<i>Methylobacterium extorquens</i>	99,9
ME2 [Z23156]	<i>Methylobacterium extorquens</i>	99,8
ME3 [AF531770]	<i>Methylobacterium extorquens</i>	100
ME4 [AF526936]	<i>Methylobacterium extorquens</i>	99,9

<sup>a</sup> BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

<sup>b</sup> EMBL: European Molecular Biology Laboratory (<http://woody.embl-heidelberg.de/gene2est/>)

Die partiellen 16S rRNA Sequenzen der Methylotrophen befinden sich im Anhang. In den weiterführenden Versuchen mit Methylotrophen wurde der Stamm *Methylobacterium extorquens* ME4 eingesetzt.



**Tab. B-6:** Eigenschaften des Stammes *Methylobacterium extorquens* ME4.

Getestete Reaktion	Ergebnis
Zellform	Stäbchen
Breite [ $\mu\text{m}$ ]	0,8 - 0,9
Länge [ $\mu\text{m}$ ]	2,5 - 4,0
Gram-Reaktion	-
Lyse durch 3 % KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Oxidase	+
Catalase	+
Pigmentierung	Pink
ADH	-
Denitrifikation (24 h)	-
Urease	+
Indolproduktion	-
Hydrolyse von Gelatine	-
Hydrolyse von Esculin	-
Substratverwertung	
D-Glukose	+ Wachstum, aber keine Farbstoffbildung
L-Arabinose	-
Citrat	-
Mannose	-
Fruktose	-
Trehalose	-
Sorbit	-
Inosit	-
Mannit	-
Gluconat	-
Malat	+
Ethanol	+
Methanol	+
Methylamin	+
Dimethylamin	-

### 3.3 Untersuchung zur Wirkung von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf Erdbeerkalluskulturen

Studien mit Erdbeerkalluskulturen zeigten, dass nach zufälliger Kontamination der Kalluskulturen mit dem Bakterium *Methylobacterium extorquens* der charakteristische Erdbeeraromastoff 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol™) gebildet wurde (Zabetakis 1997). Aufgrund seiner einzigartigen organoleptischen Eigenschaften und seines sehr breiten Vorkommens in Früchten und verarbeiteten Lebensmitteln zählt Furaneol™ weltweit zu den wirtschaftlich bedeutensten Aromakomponenten (Cheetham, 1997; Schwab und Roscher, 1997).

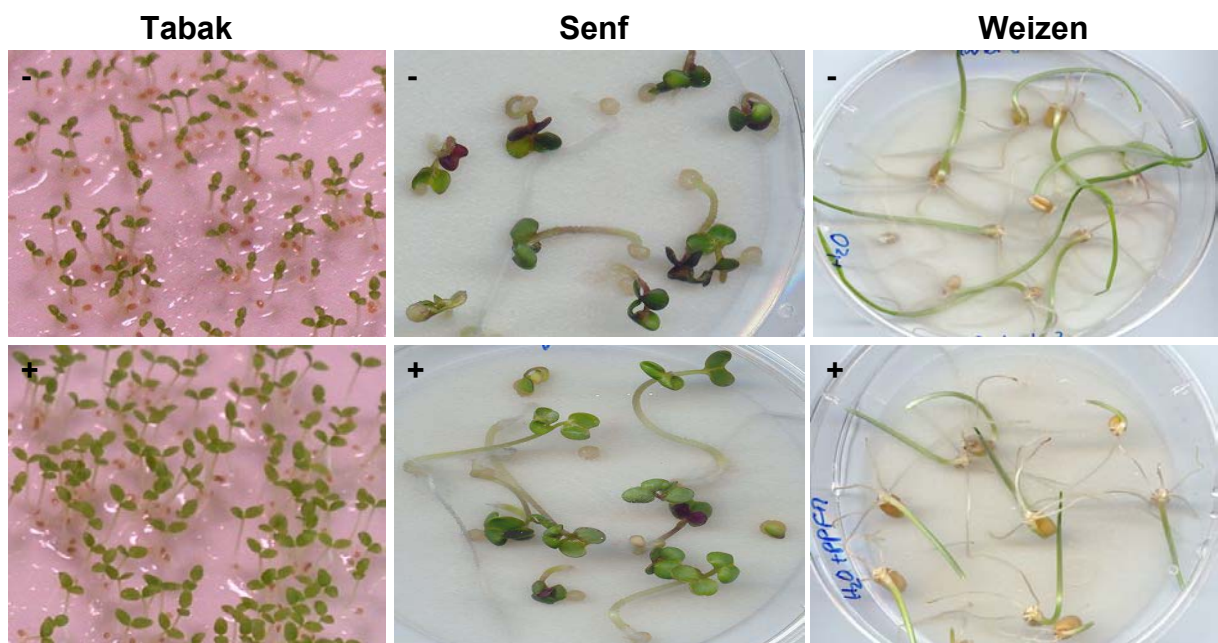
Zur Überprüfung der von Zabetakis publizierten Ergebnisse, erfolgte ein Test *in vitro* mit dem von Erdbeerblättern isolierten Stamm *Methylobacterium extorquens* ME4 und steril angezogenen Erdbeerkalluskulturen, welche dankenswerterweise von Frau Dr. Gresser, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt wurden. Hierzu sind die Kalluskulturen mit der bakteriellen Kulturlösung inokuliert worden. Innerhalb von 14 Inkubationstagen unter sterilen Bedingungen, färbte sich der mit *Methylobacterium extorquens* ME4 infizierte Kallus braun während der Kontrollkallus seine grüne Farbe behielt. Die anschließende GC-MS-Analytik lieferte keinen Hinweis auf die Bildung der gesuchten Verbindung in beiden Kalli. Im Gegensatz zu Studien von Zabetakis konnte 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol™) in beiden Kalli nicht nachgewiesen werden.

### 3.4 Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Samenkeimung

In zahlreichen Untersuchungen wurde der positive Einfluss von Methyloprophen auf das Wachstum von Pflanzen beschrieben (Holland und Polacco 1994; Ivanova *et al.*, 2000). Kalyaeva und Mitarbeiter berichteten über signifikante Biomassenzunahme, wenn Pflanzen mit Methyloprophen kokultiviert wurden (Kalyaeva *et al.*, 2001). Der Einfluss des aus Erdbeerblättern isolierten Bakteriums *Methylobacterium extorquens* ME4 wurde deshalb *in vitro* auf die Keimung verschiedener Samen (*Daucus carota*, *Fragaria x ananassa*, *Hordeum vulgare*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgare*, *Pisum sativum*, *Sinapsis alba*, *Triticum aestivum*, *Zea*

mays) in Gegenwart und in Abwesenheit von 0,5 %igem und 1,0 %igem Methanol untersucht. Hierzu wurden die Samen vor den Experimenten durch Behandlung mit 12 %iger Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert. Nach Kontamination mit dem methylotrophen Bakterium erfolgte die Inkubation unter Licht. Schließlich wurden die Länge und das Gewicht der gebildeten Keimlinge gemessen.

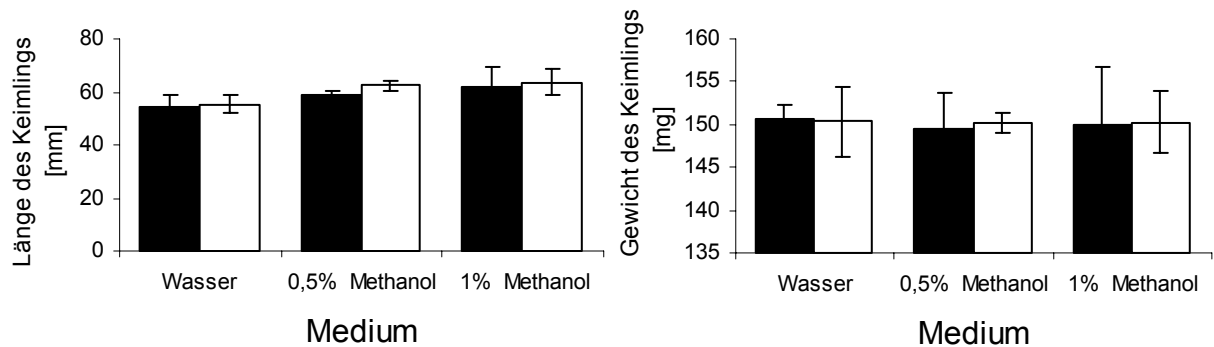
Die Bilder von Tabak-, Senf- und Weizenkeimlingen in Abwesenheit und Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 sind in Abbildung B-20 abgebildet. Als Wachstumsmedium diente steriles Wasser (H<sub>2</sub>O).



**Abb. B-20:** Tabak-, Senf- und Weizenkeimlinge in Abwesenheit (-) und Gegenwart (+) von *Methylobacterium extorquens* ME4 nach siebentägigem Wachstum in sterilem Wasser.

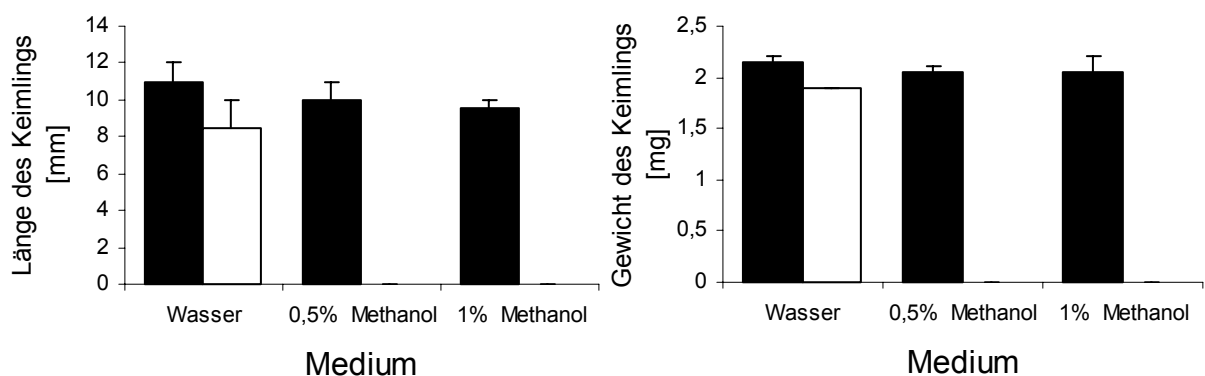
Die Keimlingslänge und das Keimlingsgewicht der Weizenkörner wurden durch die Behandlung der Samen mit *Methylobacterium extorquens* ME4 in Gegenwart oder Abwesenheit von Methanol (0,5 % und 1,0 %) nicht signifikant beeinflusst. Auch in sterilem Wasser wurde kein Unterschied festgestellt, wie in der Abbildung B-21 dargestellt ist. Das Keimungsverhalten von Gersten- und Maissamen ist durch die Behandlung mit *Methylobacterium extorquens* ME4 ebenfalls nicht signifikant beeinflusst worden (Tab. B-7).

## Ergebnisse & Diskussion



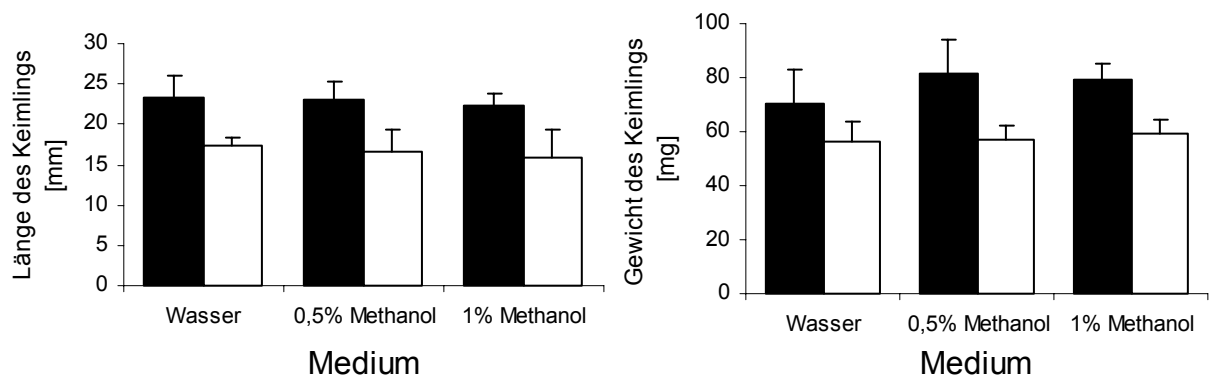
**Abb. B-21:** Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung von Weizenkörnern in sterilem Wasser, 0,5 %iger und 1,0 %iger Methanollösung. Gemessen wurden die Länge in mm (linke Abbildung) und das Gewicht in mg (rechte Abbildung) des Keimlings in Gegenwart (■) und in Abwesenheit (□) von *Methylobacterium extorquens* ME4.

Im Unterschied zu Weizen-, Gersten- und Maissamen wurde jedoch die Keimung der Erdbeersamen bereits durch 0,5 %ige bzw. 1,0 %ige Methanollösung komplett gehemmt (Abb. B-22). In Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 hingegen keimten die Erdbeersamen wieder. Da *Methylobacterium extorquens* ME4 Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann, war dieser Mikroorganismus in der Lage, dass für die Erdbeerembryonen cytotoxische Methanol zu entfernen und somit eine normale Keimung zu ermöglichen. Mit sterilem Wasser als Keimungsmedium waren die mit *Methylobacterium extorquens* ME4 wachsenden Erdbeerkeimlinge signifikant länger und schwerer als die nicht kontaminierten.

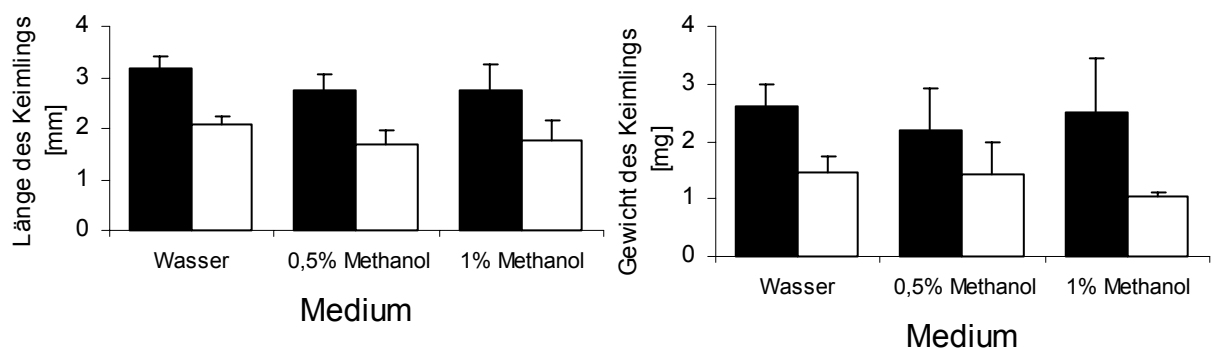


**Abb. B-22:** Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung von Erdbeersamen in sterilem Wasser, 0,5 %iger und 1 %iger Methanollösung. Gemessen wurden die Länge in mm (linke Abbildung) und das Gewicht in mg (rechte Abbildung) des Keimlings in Gegenwart (■) und in Abwesenheit (□) von *Methylobacterium extorquens* ME4.

Methanolische Lösungen beeinflussten hingegen nicht das Keimungsverhalten von Gelbsenf- und Tabaksamen. In Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 bildeten Gelbsenf- und Tabaksamen jedoch deutlich längere und schwerere Keimlinge aus, was zu signifikant höheren Biomassen führte (Abb. B-23; B-24). Neben Senf und Tabak war eine Zunahme der Biomassen in Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 auch bei Tomaten- und Möhrenkeimlingen feststellbar (Tab. B-7). Die Untersuchungen zeigten, dass *Methylobacterium extorquens* offensichtlich das Wachstum bestimmter Pflanzen beeinflussen konnte.



**Abb. B-23:** Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung von Senfsamen in sterilem Wasser, 0,5 %iger und 1 %iger Methanollösung. Gemessen wurden die Länge in mm (linke Abbildung) und das Gewicht in mg (rechte Abbildung) des Keimlings in Gegenwart (■) und in Abwesenheit (□) von *Methylobacterium extorquens* ME4.



**Abb. B-24:** Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung von Tabaksamen in sterilem Wasser, 0,5 %iger und 1 %iger Methanollösung. Gemessen wurden die Länge in mm (linke Abbildung) und das Gewicht in mg (rechte Abbildung) des Keimlings in Gegenwart (■) und in Abwesenheit (□) von *Methylobacterium extorquens* ME4.

**Tab. B-7:** Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung von Gersten-, Mais-, Möhren- und Tomatensamen in sterilem Wasser, 0,5 %iger und 1 %iger Methanollösung. Gemessen wurde das Gewicht (GW) in mg und die Länge (LK) in mm des Keimlings. Gersten- und Maissamen sind durch die Behandlung mit ME4 nicht signifikant beeinflusst worden, während eine Zunahme der Biomassen bei Tomaten- und Möhrenkeimlingen festgestellt wurde.

Samen- behandlung	Medium					
	Wasser		0,5 % Methanol		1 % Methanol	
	GW	LK	GW	LK	GW	LK
<b>Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)</b>						
ohne ME4	117,8 ± 4,4	87,3 ± 1,9	123,2 ± 7,8	77,8 ± 2,9	119,5 ± 8,0	81,9 ± 3,4
mit ME4	119,6 ± 6,0	94,5 ± 2,8	119,7 ± 6,8	83,0 ± 2,3	121,8 ± 4,5	86,2 ± 1,6
<b>Mais (<i>Zea mays</i>)</b>						
ohne ME4	488,4 ± 12,2	59,1 ± 7,0	528,3 ± 21,8	60,2 ± 4,6	514,3 ± 14,7	61,7 ± 2,7
mit ME4	512,1 ± 17,6	62,4 ± 4,5	532,4 ± 27,1	61,0 ± 0,0	544,2 ± 22,2	64,2 ± 1,3
<b>Möhren (<i>Daucus carota</i>)</b>						
ohne ME4	9,2 ± 1,2	10,3 ± 2,0	9,5 ± 1,8	11,1 ± 1,6	9,6 ± 0,7	11,0 ± 2,7
mit ME4	9,9 ± 0,6	10,9 ± 1,5	10,6 ± 2,1	9,7 ± 1,9	9,7 ± 2,2	9,9 ± 1,3
<b>Tomaten (<i>Lycopersicon esculentum</i>)</b>						
ohne ME4	25,9 ± 2,1	17,8 ± 2,6	23,0 ± 2,1	16,1 ± 5,0	23,4 ± 5,2	18,8 ± 6,8
mit ME4	37,1 ± 8,7	31,5 ± 5,8	28,4 ± 3,6	23,8 ± 1,8	32,3 ± 7,2	25,8 ± 7,7

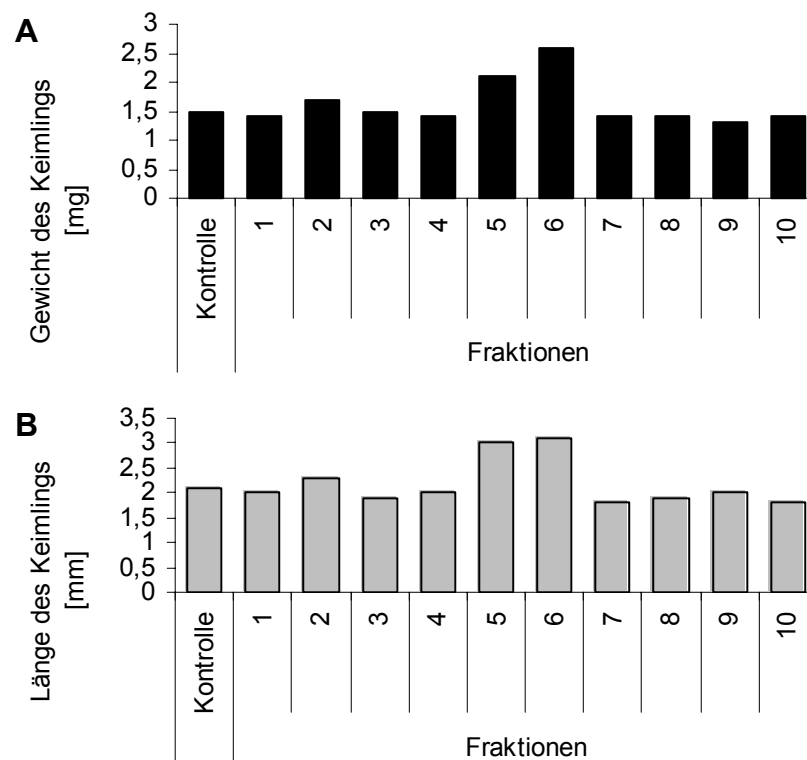
### 3.5 Nachweis wachstumsfördernder Inhaltsstoffe bei *Methylobacterium extorquens* ME4

Die Bildung von Vitamin B<sub>12</sub> bei Methylotrophen und sein wachstumsfördernder Effekt auf Kartoffel- und Tabakpflanzen wurden bereits beschrieben (Toraya *et al.*, 1975; Kalyaeva *et al.*, 2001). Folglich ist Vitamin B<sub>12</sub> als wachstumsfördernde Substanz bei der Keimung von Tabaksamen getestet worden. Hierzu wurden oberflächensterilisierte Tabaksamen mit steril verdünnten Vitamin B<sub>12</sub>-Lösungen behandelt und zur Keimung gebracht.

Im Unterschied zu Studien von Kalyaeva und Mitarbeitern (Kalyaeva *et al.*, 2001) konnte keine Biomassenzunahme bei den mit Vitamin B<sub>12</sub> behandelten Tabaksamen festgestellt werden. Somit konnte die Beteiligung von Vitamin B<sub>12</sub> an der in dieser Untersuchung festgestellten Biomassenzunahme ausgeschlossen werden.

Zur Identifizierung der wachstumsfördernden Substanzen in den Kulturlösungen von *Methylobacterium extorquens* ME4, wurden diese mittels Festphasenextraktion an RP-18 isoliert. Nach dem Eluieren der Überstände mit Methanol, sind die Extrakte ankonzentriert, in wenig Wasser aufgenommen und anschließend mittels semi-präparativer HPLC fraktioniert worden. Nach der Entfernung des Lösungsmittels wurden die Extrakte in sterilem Wasser gelöst und mittels Keimungsversuche mit Tabaksamen zum Nachweis wachstumsfördernder Substanzen untersucht.

Wie aus der Abbildung B-25 hervorgeht, stimulierten die wässrigen Lösungen der Fraktionen 5 und 6 das Keimlingsgewicht und die Keimlingslänge im Vergleich zur Kontrolle (Keimung nur in Gegenwart von sterilem Wasser). Die Ansätze mit anderen Fraktionen wiesen dagegen keinen Effekt auf. In den Fraktionen 5 und 6 waren somit Substanzen vorhanden, die offensichtlich das Wachstum von Tabaksamen förderten und die Biomassen der Keimlinge erhöhten.



**Abbildung B-25:** Einfluss der mittels semi-präparativer HPLC erhaltenen Fraktionen von mit Methanol behandelter *Methylobacterium extorquens* ME4 Kulturlösung auf das Wachstum von Tabaksamen. Als Kontrolle dienten die in sterilem Wasser keimenden Tabaksamen. Gemessen wurden das Gewicht in mg (A) und die Länge in mm (B) des Keimlings.

Eine Auftrennung und Identifizierung dieser Substanzen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gelungen. Dennoch lässt sich vermuten, dass es sich bei diesen Stoffen nicht um Proteine, sondern um mittelpolare Moleküle handelt, da die Substanzen erst mit 55-60 % Acetonitril von der RP-18-Säule eluiert wurden.

### 3.6 Diskussion der Ergebnisse

Der von Erdbeerblättern isolierte methylo tro phe Stamm *Methylobacterium extorquens* ME4 zeigte in der Interaktion mit einigen Samensorten wachstumsfördernde Eigenschaften. In Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 konnte bei Tabak, Senf, Tomaten, Möhren und Erdbeeren eine signifikante Biomassenzunahme festgestellt werden. Die Fähigkeit des methylo tro phen Stammes *Methylovorus mays*, das Wachstum von Tabak- und Kartoffelpflanzen ohne Zusatz von Methanol zu fördern, wurde beschrieben (Kalyaeva *et al.*, 2001). Nonomura und Benson (1992) berichteten hingegen über eine Verdopplung des Wachstums von C<sub>3</sub>-Pflanzen in trockenen Gebieten, wenn diese mit 10-50 % Methanol besprüht wurden. Noshi und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine 30 %ige Erhöhung der Biomassen bei Sojabohnenpflanzen feststellen, nachdem die Blätter mit einer 15 %iger Methanollösung behandelt worden waren (Noshi *et al.*, 1993). Im Unterschied zu diesen Studien, zeigten die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass Methanol keinen Effekt auf das Keimungsverhalten von oberflächensterilisierten Gersten-, Mais-, Tabak-, Senf-, Tomaten-, und Möhrensamen aufwies. Eine 0,5 %ige methanolische Lösung inhibierte zwar die Keimung von Erdbeersamen vollständig, aber erst in Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 konnten die Erdbeersamen normal keimen. Das für Erdbeersamen cytotoxische Methanol wurde vermutlich durch *Methylobacterium extorquens* ME4 entfernt. Diese Hypothese steht im Einklang mit Untersuchungen von Joshi und Holland, bei denen festgestellt wurde, dass ein Einfluss von Methanol bei Pflanzen unter Streß nur in Gegenwart von methylo tro phen Bakterien möglich war (Joshi und Holland, 1999). Bei ihren Feldversuchen mit Weizen, Gersten und Erbsen fanden Albrecht und Mitarbeiter (1995) jedoch weder einen positiven noch einen negativen Effekt von Methanol auf das Wachstum dieser Nutzpflanzen. Eine Akkumulation von Methanol in reifenden Samen ist zwar beschrieben worden (Obendorf *et al.*, 1990), jedoch wird der Alkohol



beim Wachstum der Pflanzen als Abfallprodukt, und nicht als wachstumsfördernde Verbindung diskutiert (MacDonald und Fall, 1993; Nemeck-Marshall *et al.*, 1995). Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nicht das Methanol beim Wachstum der getesteten Samenarten eine Rolle spielt, sondern die Methyloprophen. Wie schon angedeutet, kommen die methyloprophen Bakterien ubiquitär in der Natur vor, was die von Nonomura und Benson (1992) erzielten Ergebnisse erklärt. Die methyloprophen Bakterien sind in der Lage Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und können den Pflanzen wachstumsfördernde Substanzen zur Verfügung stellen. Dazu sind in den letzten Jahren mehrere Artikel erschienen, die die Interaktion von Methyloprophen mit Pflanzen beschreiben (Holland und Polacco, 1994; Donina *et al.*, 2000). Methyloprophen sollen das Methanol, welches von Pflanzen emittiert wird, als Kohlenstoffquelle nutzen und das Phytohormon Cytokinin, das von den Methyloprophen gebildet wird, an die Pflanzen abgeben (Joshi und Holland; 1999). Dorinina und Mitarbeiter (2000, 2002) konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass Methyloprophen nicht nur Cytokinine produzieren, sondern zusätzlich viele weitere wachstumsregulierende Wirkstoffe wie Auxine und Exopolysaccharide bilden. Obwohl die Bildung von Vitamin B<sub>12</sub> bei Methyloprophen und dessen wachstumsfördernder Effekt auf die Pflanzen beschrieben worden ist (Toraya *et al.*, 1975), konnte in dieser Arbeit kein Einfluss von Vitamin B<sub>12</sub> auf das Wachstum von keimenden Tabaksamen festgestellt werden.

Dennoch konnte in den hier präsentierten Studien gezeigt werden, dass der von Erdbeerblättern isolierte methyloprope Stamm *Methylobacterium extorquens* ME4 mindestens eine Substanz synthetisiert, die das Wachstum von Pflanzen fördert. Obwohl diese Verbindung nicht identifiziert werden konnte, wurde eindeutig gezeigt, dass *Methylobacterium extorquens* ME4 das Samenwachstum von Pflanzen *in vitro* stimulieren und die Biomasse bei der Samenkeimung erhöhen kann.

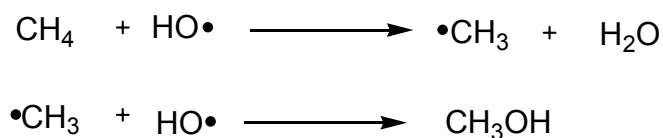
## 4 Methanol aus wachsenden Keimlingen

### 4.1 Vorkommen von Methanol in der Atmosphäre

Über die Konzentration von Methanol in der Atmosphäre sind bisher nur wenige Daten bekannt. Lahman und Mitarbeiter führten Luftmessungen in West-Berlin durch und fanden Konzentrationen von 3-59 ppbv Methanol (Lahman *et al.*, 1978). Die von Singh und Mitarbeiter im Frühjahr 1994 durchgeführten Messungen über dem Pazifischen Ozean ergaben für Methanol Konzentrationen von 10 ppbv (Singh *et al.*, 1995). Ferner lieferten gaschromatographische Messungen in der Nähe von Garmisch-Partenkirchen Konzentrationen von 56 ppbv an Methanol (Leibrock und Slemr, 1997).

Pflanzen können Methanol abgeben. Diese Emission wurde für Baumwollpflanzen, Sojabohnen und bestimmte Gräser gezeigt (MacDonald und Fall, 1993). Grundsätzlich bilden Pflanzen bedeutende Mengen an flüchtigen organischen Komponenten (volatile organic compounds, VOC), die jährlich auf 500-825 tg geschätzt werden (Fehsefeld *et al.*, 1992). Diese Verbindungen spielen verschiedene Rollen in der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen, z.B. als Alarmstoff oder Energiequellen (Roshchina and Roshchina, 1993). Weitere natürliche Quellen für Methanol sind die Biomassenverbrennung (Holzinger *et al.*, 1999), Pflanzenabfälle (Warneke *et al.*, 1999), chemische Reaktionen in der Atmosphäre und Ozeane (Singh *et al.*, 2000).

Als wichtiger Bildungsprozess für Methanol in der Atmosphäre gilt der Abbau des entsprechenden Kohlenwasserstoffs Methan (Fabian, 1992).

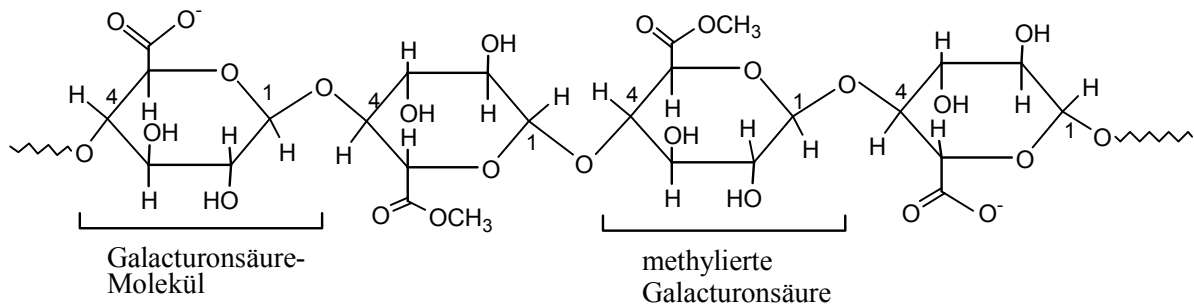


Die Freisetzung von Methanol aus pflanzlichen Materialien ist seit über 30 Jahren bekannt. Erste Erkenntnisse zum Vorkommen von Methanol lieferten die Arbeiten von Nursten (1970), Fisher und Mitarbeitern (1979), die den Alkohol in verschiedenen Früchten bzw. keimenden Samen gefunden haben. Auch die Arbeit der Gruppe um Obendorf wies auf eine Anhäufung von Methanol in reifenden Sojabohnensamen hin (Obendorf *et al.*, 1990). Die Autoren schlossen daraus, dass eine direkte Korrelation zwischen dem Gehalt an Methanol und dem Alter der pflanzlichen Organismen besteht.

### 4.2 Quelle von Methanol in Pflanzen

Die Methanolbildung bei Pflanzen wird grundsätzlich auf die Demethylierung von Pektin mit Hilfe des Enzyms Pektinmethylesterase (PME) zurückgeführt (Fall und Benson, 1996; Galbally und Kirstine, 2002; Fall, 2003). Andere Synthesewege zur Entstehung des Alkohols wurden auch beschrieben, wie z.B. der von Cossins (1987) vorgeschlagene Stoffwechsel von Tetrahydrofolat oder der durch Pilze verursachte Abbau von Lignin in den sekundären Zellwänden (Anders *et al.*, 1985). Die meisten bisher durchgeführten Studien deuteten dennoch darauf hin, dass Pektin die Hauptquelle von Methanol in Pflanzen ist. Sowohl das Pektin als auch das Enzym liegen in pflanzlichen Zellwänden vor (Obendorf *et al.*, 1990).

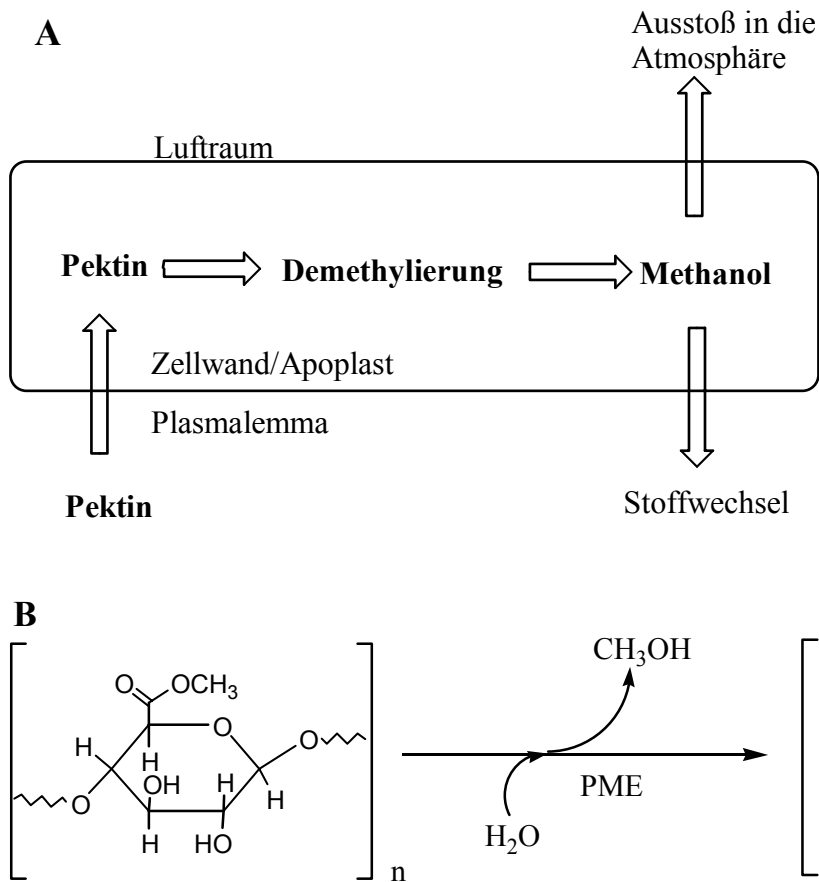
Pektin ist ein Mischpolymerisat aus sauren Polysacchariden, wobei der Hauptbestandteil die Polygalacturonsäure ist. Polygalacturonsäure besteht vorwiegend aus 1,4-verknüpften  $\alpha$ -D-Galacturonsäure (Abb. B-26). In geringer Menge enthält Pektin auch D-Galactane, L-Arabinane und Arabinogalactane in kovalenter Bindung an das Galacturonan. Die Carboxylgruppen der Galacturonsäurereste sind in unterschiedlichem Maße mit Methanol verestert, die Hydroxygruppen können in geringem Umfang acetyliert sein. Bleibt die Carboxylgruppe unverestert, so spricht man von Pektinsäure; ist sie dagegen zum größten Teil mit Methanol verestert, so liegt das Pektin vor.



**Abb. B-26:** Der Aufbau von Pektin (Ausschnitt).

Pektinstoffe zählen neben der Cellulose und den Hemicellulosen zu den elementaren Strukturpolysacchariden der Primärzellwände in jungem, d.h. noch wachstumsfähigen Gewebe aller höheren Landpflanzen, wobei sie bei den Dikotyledonen und einigen Monokotyledonen ca. 35 % der Zellwandtrockenmasse ausmachen, bei Gräsern nur ca. 5 % (Neidhart, 1997). Die mit 10 bis 30 % höchste Pektinkonzentration im pflanzlichen Gewebe ist allerdings zwischen den Primärwänden in den Mittellamellen lokalisiert (Darvill *et al.*, 1980; van Buren, 1991). Diese Pektinstoffe sind für den Zusammenhalt der Zellen im jungen Gewebe verantwortlich.

Wie bereits angedeutet, entsteht Pektin überwiegend bei wachstumsfähigen Pflanzengeweben. Während der Zellteilung werden sowohl die Glykosidbindungen als auch Esterbindungen gespalten, letztere durch Freisetzung von Methanol aus Galacturonsäureestern. Wie aus Abbildung B-27B hervorgeht, erfolgt die Freisetzung mit Hilfe des Enzyms Pektinmethylesterase. Das gebildete Methanol wird zum größten Teil in die Atmosphäre ausgeschieden (Abb. B-27A), während ein geringer Teil in das Innere der Zelle zurückfließen kann, um dort metabolisiert zu werden (Fall, 2003). Die freien Carboxylgruppen der Galacturonsäuren sind des Weiteren verantwortlich für die Verknüpfung der Pektinketten untereinander. Je zwei geladene Carboxylgruppen können mit zweiwertigen Kationen Ionenbindungen eingehen, dabei bildet sich eine Brücke, die die Makromoleküle in einem Netz zusammenhält (Nari *et al.*, 1991).



**Abb. B-27:** Bildung von Methanol in Pflanzen. Die schematische Darstellung zeigt die Bildung in den Zellwänden (A) und die Demethylierungsreaktion durch das Enzym Pektinmethylesterase [PME] (B).

#### 4.3 Verfahren zur Bestimmung von Methanol bei der Keimung

Zur Bestimmung leichtflüchtiger Verbindungen aus keimenden Pflanzen sind bislang nur wenig Analysenmethoden veröffentlicht worden (Obendorf *et al.*, 1990; MacDonald und Fall, 1993; Nemecek-Marshall *et al.*, 1995).

MacDonald und Fall (1993) stellten ein empfindliches und selektives Verfahren zur Bestimmung von Methanol in der Atmosphäre vor. Der aus pflanzlichen Blättern freigesetzte gasförmige Alkohol wurde bei Laborversuchen mit einem Luftstrom in einem 7 cm<sup>3</sup> großen Behälter aufgefangen und anschließend gaschromatographisch mittels FID (Flame Ionisation Detection) bestimmt. Mit diesem Verfahren ließen sich ohne Anreicherung Nachweisgrenzen von 0,6 µg Methanol pro Gramm Trocken-

gewicht erzielen. Die Autoren stellten außerdem fest, dass sich die durch Blätter freigesetzte Methanolmenge mit denen der mengenmäßig wichtigsten natürlichen flüchtigen Komponenten vergleichen ließ. Die Menge an Methanol, 13,2 µg/g, war zwar geringer als die von Isoprenen (35 µg/g), aber deutlich höher als die Konzentrationen an Monoterpenen, mit 1,6 µg/g. Der sicherheitstechnische und apparative Aufwand hierbei ist allerdings sehr hoch, so dass dieses Verfahren für Feldmessungen nur bedingt einsetzbar ist.

Eine einfachere enzymatische Methode ist bei Nemecek-Marshall und Mitarbeitern (1995) beschrieben. Der Alkohol wurde mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase (AO) in einer wässrigen, alkalischen Kaliumphosphatlösung zu Formaldehyd oxidiert. Formaldehyd wurde anschließend nach Umsetzung mit dem Farbstoff 4-Amino-3-penten-2-on (Fluoral-P) photometrisch bestimmt. Das Verfahren erwies sich als kostengünstig, einfach und selektiv. Nachteile der bisher nur im Labor erprobten Methode lagen in der für die Bestimmung von Methanol in der Atmosphäre zu hohen Nachweisgrenze und der geringeren Stabilität des Endprodukts. Die erzielte Nachweisgrenze für Methanol lag bei 0,02 µg/g.

Johansen und Mitarbeiter (1997) bestimmten mehrere Gase gleichzeitig, unter ihnen Methanol, in der Umgebungsluft. So konnten Konzentrationen von 5 ppm an Methanol mittels FT-IR-Spektrometer gemessen werden.

Eine schnelle und einfache Methode wurde von Lindinger und Mitarbeitern (1998) zur Bestimmung leichtflüchtiger organischer Verbindungen in Gasproben vorgestellt. Die flüchtigen Verbindungen reagieren zunächst mit  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen in dem Reaktionsraum eines Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometers (PTR-MS) unter Bildung von protonierten Pseudomolekülionen. Aus dem Reaktionsraum werden die entstandenen Ionen in das Detektionssystem geleitet, wo ihre Masse und ihre Anzahl bestimmt werden. Die Anzahl der am Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV) registrierten Ionen ist proportional zur Konzentration der gesuchten Verbindungen in der untersuchten Gasprobe. Mit dem PTR-MS wurden Konzentrationen von 2,5 ppm an Methanol nachgewiesen (Boschetti *et al.*, 1999).

#### **4.3.1 Oxidation von Methanol mit Hilfe des Enzyms Alkoholoxidase (AO)**

Zur Bestimmung von Methanol aus Keimpflanzen wurde die enzymatische Methode nach Nemecek-Marshall und Mitarbeitern (1995) verwendet. Weder bei den Tabakkeimlingen, die nicht mit *Methylobacterium extorquens* ME4 behandelt worden waren, als auch bei den Keimlingen, die mit Methylo-trophen inokuliert worden waren, konnte eine signifikante Menge an Methanol mit Hilfe der beschriebenen Methode detektiert werden. Aus ermittelten Eichkurven war zu ersehen, dass eine messbare Umsetzung praktisch erst ab einer Methanolkonzentration von 1 mg/g erfolgen konnte. Es wurde deshalb angenommen, dass die aus wachsenden Keimlingen freigesetzten Konzentrationen an Methanol offenbar unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

#### **4.3.2 Bestimmung von Methanol mittels Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)**

Als alternative Messmethode zur Bestimmung von Methanol in der Gasphase wurde die PTR-MS-Analytik verwendet. Dazu wurden die unter Luftausschluss wachsenden Keimlinge, die mit oder ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 behandelt worden waren, untersucht. Vor der nachfolgenden Beschreibung der PTR-MS-Ergebnisse wird zunächst ein Einblick in die analytischen Grundlagen der PTR-MS vorgestellt.

##### **4.3.2.1 PTR-MS Grundlagen**

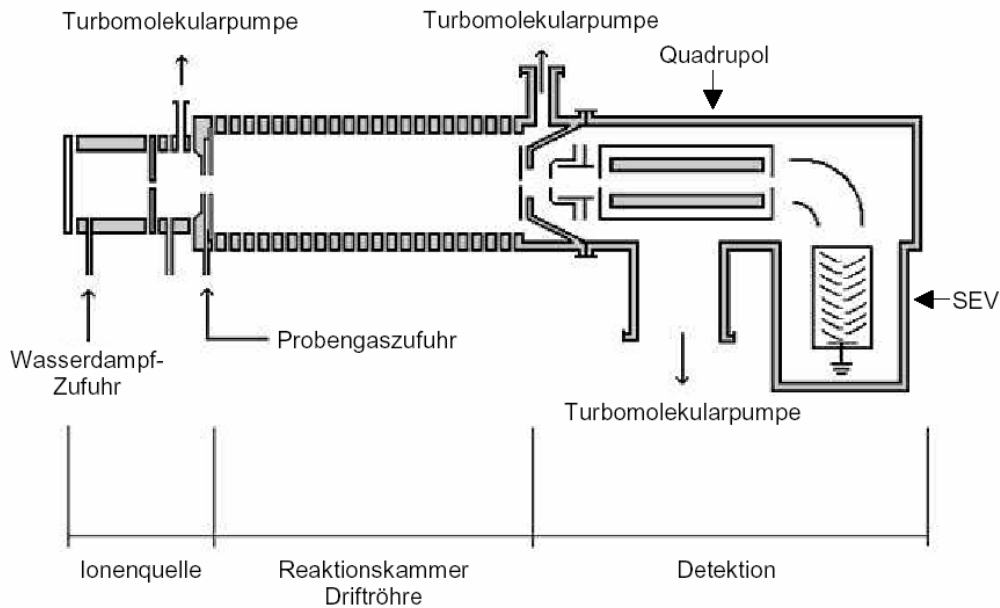
Mit einem Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometer (PTR-MS) können leichtflüchtige organische Verbindungen (volatile organic compounds, VOCs) direkt ohne Vorkonzentrieren sehr sensitiv (bis zu einige ppbv) in Gasproben quantifiziert werden. Die Methode basiert auf der Reaktion von  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen mit VOCs, wobei Protonen ohne Dissoziation der Moleküle übertragen werden. Die erzeugten Ionen werden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Der Vorteil der Methode liegt in dem sehr geringen Anteil von Fragmentmolekülen und der sehr effizienten Ionisation der Spurengase, da keine Reaktionen mit Bestandteilen der reinen Luft

auftreten. Insbesondere ist eine Beimischung von Wasserdampf zu dem zu analysierenden Gas unkritisch.

In Abbildung B-28 ist der Messaufbau schematisch dargestellt. In der Ionenquelle werden die  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen in einer möglichst hohen Dichte und Reinheit produziert. Je höher das Primärionensignal ist, desto besser ist die Nachweisempfindlichkeit. Die Ionenproduktion wird über eine Hohlkathodenentladung erreicht, bei der durch Elektronenstoß mit Wasserdampf die  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen entstehen. In der Driftröhre werden die  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen Protonen auf die VOCs übertragen, die über die Probengaszufuhr eingelassen werden. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes bewegen sich die Ionen mit dem Probegas in Richtung Detektion. Abhängig von der jeweiligen Reaktionskonstante  $k$  für den Protonentausch und der zur Verfügung stehenden Reaktionszeit  $t$  werden die Produktionen gebildet. Die Messung der  $\text{H}_3\text{O}^+$ - und Produktionen erfolgt im Detektionsteil. Mittels eines Linsensystems werden am Ende der Driftröhre die Ionen in den Detektionsraum beschleunigt. Die Massenselektion wird mit einem konventionellen Quadrupol (Balzers QMG 422) durchgeführt und die Ionen werden mit einem Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV) registriert. Die Zählraten sind direkt proportional zu den jeweiligen Konzentrationen. Aus den bekannten Größen  $k$  und  $t$  kann auf die Konzentration des neutralen VOC-Spurengases zurückgeschlossen werden. Eine detaillierte technische Beschreibung des PTR-MS-Systems findet sich bei Lindinger und Mitarbeitern (1998).

Wie bei allen massenspektrometrischen Meßmethoden wird mit dem PTR-MS das Molekulargewicht der analysierten Substanz bestimmt (genauer: Masse/Ladung). In vielen Fällen gibt es verschiedene Substanzen, die auf derselben Masse zu liegen kommen. Um zwischen solchen isobaren Molekülen zu differenzieren, sind zusätzliche Informationen oder Messungen nötig. Im Fall von Methanol (Masse 32 amu) ist nun bekannt, dass es stark von Pflanzen emittiert wird (König *et al.*, 1995; Nemecek-Marshall *et al.*, 1995; Kirstine *et al.*, 1998) und andere (höchstens isotopisch bedingte) Beiträge zu dieser Masse demgegenüber sehr klein sind. Man kann deshalb bei diesen Messungen bei Masse 32 immer von Methanol sprechen. Der statistische Messfehler liegt bei den gemessenen Konzentrationen unter 1 %. Dazu muss eine Messunsicherheit von etwa 5 % berücksichtigt werden, die aus der experimentellen Bestimmung der Transmission resultiert.





**Abb. B-28:** Das PTR-MS System im Schema (Lindinger *et al.*, 1998).

#### 4.3.2.2 Ergebnisse der PTR-MS Messungen

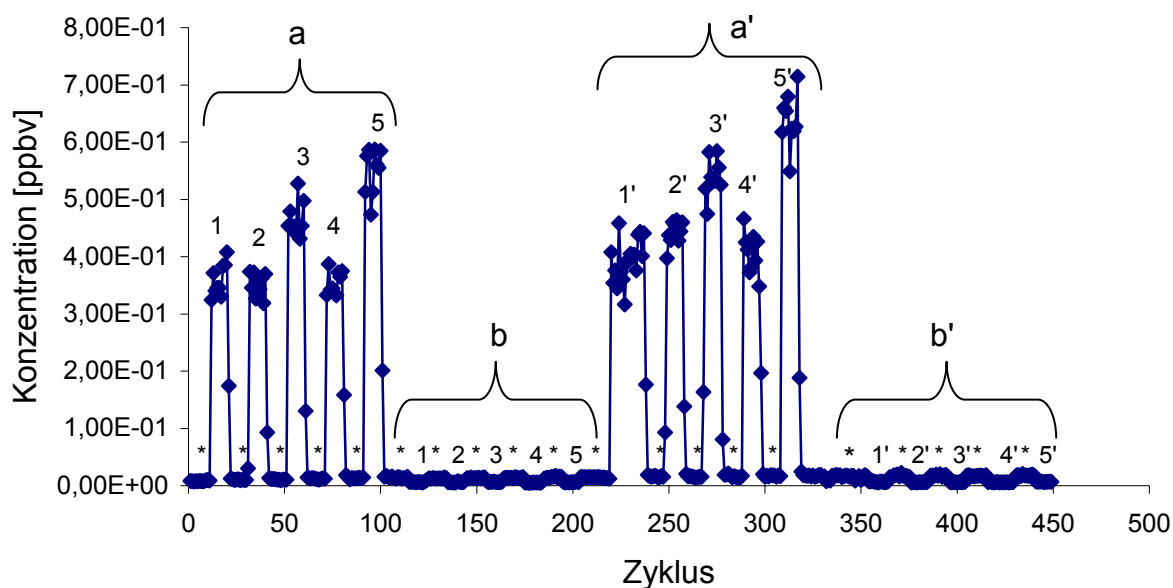
Um zu testen, ob Methanol von Keimlingen freigesetzt wird und wie diese Freisetzung von der Anwesenheit von *Methylobacterium extorquens* ME4 beeinflusst wird, wurde die Kopfraumlufte von insgesamt zehn Wägegläsern mit ca. 75 keimenden Tabaksamen analysiert. Die Tabaksamen von fünf Wägegläsern waren mit *Methylobacterium extorquens* ME4 behandelt worden. Tabaksamen wurden für diese Messung gewählt, weil sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass bei dieser Pflanzenart am ehesten eine Freisetzung von Methanol zu erwarten war. Bei Senfsamen zeigte sich z. B. keine messbare Methanolbildung.

Für die Bestimmung von Methanol aus Tabakkeimlingen wurden die Wägegläser (80 ml Volumen) mit gekeimten Tabaksamen direkt an das PTR-Massenspektrometer angeschlossen. Mit einer Nadel wurde das Septum durchstoßen und der Kopfraum des Wägeglases über einen PTFE-Schlauch mit dem Einlassventil des PTR-MS verbunden. Somit konnte das bei der Keimung freigesetzte Gasgemisch in den Analysenraum des Gerätes gezogen und analysiert werden.

Wie aus der Abbildung B-29 hervorgeht, konnte bei allen ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 wachsenden Keimlingen Methanol mit der Ionenmasse  $m/z$  33 in den Gasproben nachgewiesen werden. In den Gasproben mit *Methylobacterium extorquens* ME4 keimenden Tabaksamen konnte dagegen kein Methanol detektiert werden. Als Referenz diente Raumlufte. Damit sollte gewährleistet werden, dass die gemessenen Methanolkonzentrationen nur aus den keimenden Samen stammen und nicht schon in der nachströmenden Raumlufte vorhanden waren. In der Raumlufte konnten aber nur äußerst geringe Methanolsuren gefunden werden. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass das gebildete Methanol tatsächlich aus keimenden Tabaksamen stammt. So konnten Konzentrationen von 0,4 bis 0,7 ppbv Methanol pro Ansatz (ca. 75 Keimlinge / 80 ml Volumen des Wägeglasses) bei wachsenden Tabaksamen ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 gemessen werden.

Neben Methanol waren auch andere flüchtige Ionen in der Gasphase über Tabakkeimlingen ohne bzw. mit *Methylobacterium extorquens* ME4 nachweisbar. So konnten folgende Ionenmassen ermittelt werden:  $m/z$  42,  $m/z$  43,  $m/z$  45,  $m/z$  59 (Aceton),  $m/z$  62,  $m/z$  73 und  $m/z$  82. Ihre Identifizierung war aber für die zu bearbeitende Fragestellung nicht relevant.

Obwohl im Kopfraum der mit *Methylobacterium extorquens* ME4 aufgezogenen Keimlinge kein Methanol gegenüber den Keimlingen ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 nachweisbar war, wurde bei diesen Keimlingen dennoch eine Zunahme der Biomassen festgestellt. In Gegenwart von *Methylobacterium extorquens* ME4 bildeten Tabaksamen deutlich längere und schwerere Keimlinge aus, wobei ein durchschnittliches Gewicht von 197 mg/Ansatz ermittelt wurde, während die Ansätze mit Keimlingen ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 ein durchschnittliches Gewicht von 120 mg/Ansatz ergaben. Dies deutete darauf hin, dass das Methanol, welches aus den Keimlingen mit *Methylobacterium extorquens* ME4 freigesetzt wurde, unmittelbar von methylo-trophen Bakterien als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt wurde und das Wachstum von *Methylobacterium extorquens* ME4 zu den festgestellten Biomassenzunahmen der Keimlinge führte.

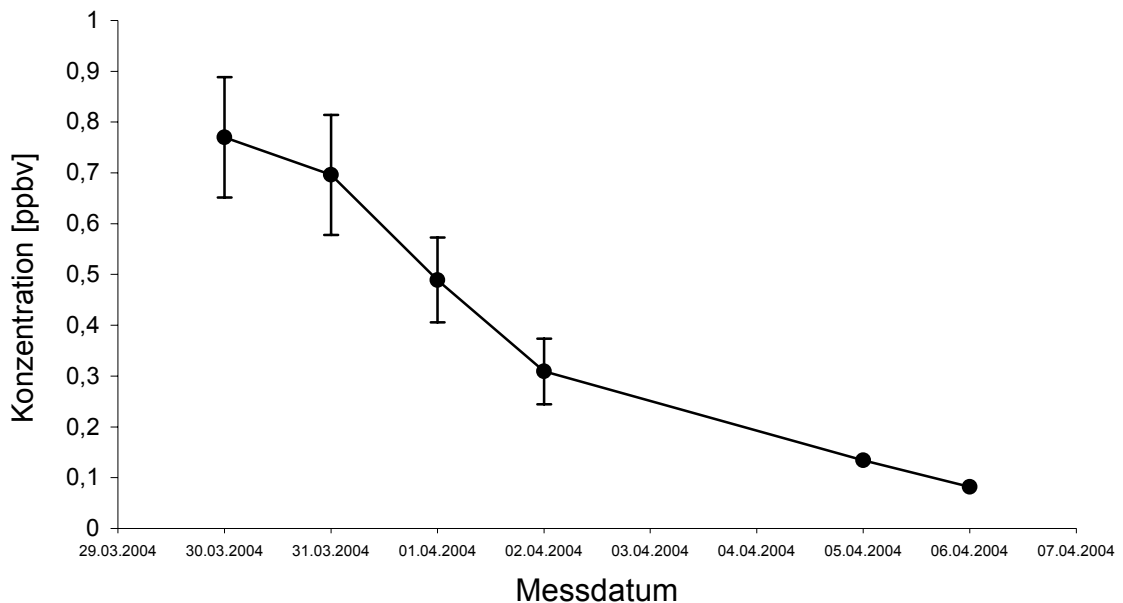


**Abb. B-29:** PTR-MS-Messreihe zur Quantifizierung der Methanolkonzentration ( $m/z$  33) in Kopfraumluf über Tabakkeimlingen in Abwesenheit (a, a') und Gegenwart (b, b') von *Methylobacterium extorquens* ME4. Die Messungen wurden nach sieben Wachstumstagen durchgeführt. Jeder Peak entspricht einem Ansatz (1-5), der doppelt bestimmt wurde (1'-5'). Zwischen den Kopfraum-Messungen wurde Raumluf gemessen (\*). Diese diente gleichzeitig als Kontrolle für die Methanolkonzentrationen in der Raumluf.

Die Bildung von Methanol bei Pflanzen hängt sehr stark vom Blattalter ab. Junge Blätter emittieren mehr Methanol in die Atmosphäre als alte Blätter (Obendorf *et al.*, 1990). Anhand eines Zeitversuches wurden die gebildeten Methanolkonzentrationen bei keimenden Tabaksamen ermittelt. Hierbei wurden sterile Tabaksamen ohne *Methylobacterium extorquens* ME4 zur Keimung eingesetzt und das freigesetzte Methanol in der Gasphase täglich gemessen.

Abbildung B-30 zeigt den Verlauf der Methanolkonzentrationen bei wachsenden Tabaksamen in Abwesenheit von *Methylobacterium extorquens* ME4 innerhalb von acht Tagen. Ein Tag nach dem Ansatz waren die Keimblätter zwar noch nicht sichtbar, aber die Samenschalen schon aufgebrochen. In diesem Stadium wurde die höchste Konzentration von etwa 0,8 ppbv an Methanol, bezogen auf die von ca. 75 Tabakkeimlingen produzierte Gasphase in 80 ml Volumen des Wägeglases, gemessen. Die Keimblätter wurden erst nach drei Tagen aus den Samen

herausgehoben. Nach zwei Tagen konnte eine leichte Verminderung der Konzentration festgestellt werden. Die Konzentrationen an Methanol nahmen dann kontinuierlich stark mit der Zeit ab. Am achten Tag konnten nur noch Methanolkonzentrationen von ca. 0,1 ppbv gemessen werden.



**Abb. B-30:** Verlauf der Methanolkonzentration bei wachsenden Tabaksamen in Abwesenheit von *Methylobacterium extorquens* ME4 innerhalb von sieben Tagen.

#### 4.4 Nachweis von Methanol bei der Keimung mit Hilfe von *Pichia pastoris* als Biosensor

##### 4.4.1 Allgemeines zu Biosensoren

Bakterielle Biosensoren sind biotechnologische Hilfsmittel zur Detektion von Analyten in einer Probe und enthalten eine biologische Sensorkomponente und ein analytisches Messelement (Ammendola, 1999). Der biologische Sensor reagiert auf die Anwesenheit des zu bestimmenden Analyten mit der Produktion eines Signals, welches von einem elektronischen, optischen oder mechanischen Detektor erfasst und quantifiziert wird (Higgings *et al.*, 1987).

In der Regel werden als biologische Komponenten Makromoleküle wie z.B. Enzyme verwendet, die in Elektroden auf Oberflächen immobilisiert sind (z.B. Katalase, Glukoseoxidase, Alkoholoxidase; Lowe, 1984).

Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken hat man bakterielle Sensorstämme mit hoher Selektivität konstruieren können. In der Regel werden dabei Promotorregionen, die auf bestimmte Umweltreize reagieren, mit Reportergenen fusioniert und in Zielbakterien überführt. Reporter gene kodieren für Proteine, die leicht nachweisbare Signale produzieren. Voraussetzung für deren Einsatz ist, dass sie nicht natürlicherweise im untersuchten System vorkommen. Reporter gene werden häufig in Genexpressionsstudien, aber auch als Komponenten einer Signaltransduktionskaskade in biologischen Sensorsystemen verwendet (Burlage *et al.*, 1994).

Zu den klassischen Reporter genen gehört beispielsweise die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) aus *E. coli*, welche die Acetylierung von Chloramphenicol katalysiert (Haugland, 1996). In den letzten Jahren sind lumineszente Reporterproteine vor allem wegen ihrer niedrigen Detektionsgrenze vermehrt eingesetzt worden. Am häufigsten werden Luziferasen und das grün fluoreszierende Protein GFP verwendet (Tsien, 1998).

Das grün fluoreszierende Protein GFP wird oft als Reporter gen für Genexpressionsstudien bzw. für die Markierung von Proteinen verwendet (Kain *et al.*, 1995). Beispielsweise kann GFP mit entsprechenden Genen endogener Proteine im gleichen Leserahmen fusioniert werden, so dass ein chimäres Protein entsteht, welches idealerweise bezüglich Funktion und Lokalisierung unverändert bleibt und zusätzlich grün fluoresziert (Ammendola, 1999). Auf diese Weise konnten viele Zellorganellen (wie z.B. Plasmamembran, Zellkern) mit GFP markiert werden (Tsien, 1998). Auch in prokaryotischen Systemen hat sich GFP als geeignetes Marker-molekül in Genexpressionsstudien erwiesen (Kremer *et al.*, 1995; Boettner *et al.*, 2002). Mit Hilfe von GFP-markierten *Erwinia herbicola* Zellen ist es Leveau und Lindow (2001) gelungen, die Verfügbarkeit von Fruktose und Glukose auf Bohnenblättern (*Phaseolus vulgaris* cv. Bush Blue Lake 274) detailliert zu untersuchen. Sie konnten somit die Freisetzungsorte dieser Zucker auf Blattoberflächen lokalisieren und sichtbar machen.

#### **4.4.2 Einsatz von *Pichia pastoris* als Biosensoren zum Nachweis von Methanol in Keimblättern**

Ausgehend von den durch Leveau und Lindow (2001) erzielten Ergebnissen, hinsichtlich der Lokalisierung von Pflanzeninhaltsstoffen auf Blattoberflächen mittels GFP-Fluoreszenz, wurden rekombinante *Pichia pastoris* Zellen zur Untersuchung der Freisetzung von Methanol von Blättern eingesetzt.

Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*, ein zunehmend verwendeter Organismus zur rekombinanten Proteinherstellung, wurde mit dem Expressionssystem (methanolsensitiver Promoter-GFP) transformiert und ist somit in der Lage den Methanolstatus im umgebenden Habitat anzuzeigen (Boettner *et al.*, 2002). Die induzierbare Proteinexpression erfolgt hierbei unter Kontrolle des durch Methanol induzierbaren Alkoholoxidase Promotors (Ellis *et al.*, 1985). Mit Hilfe der induzierbaren GFP-Expression sollte in dieser Studie aufgeklärt werden, an welchen Stellen die Blätter bevorzugt Methanol emittieren. Hierzu wurden sterile Tabaksamen mit dem transformierten Stamm *Pichia pastoris* pPICHS/GFP inokuliert und zur Keimung gebracht. Das Plasmid von *Pichia pastoris* pPICHS/GFP wurde mit dem Promotor für Alkoholoxidase und der Nukleotidsequenz, die für GFP kodiert, konstruiert. Als Kontrolle diente der Stamm pPKHS, die natürlicherweise vorkommende Form von *Pichia pastoris* (Boettner *et al.*, 2002). Nach der Aufkeimung der Tabaksamen wurde die Proteinexpression auf Blättern mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Leica TCS SP2 ermittelt.

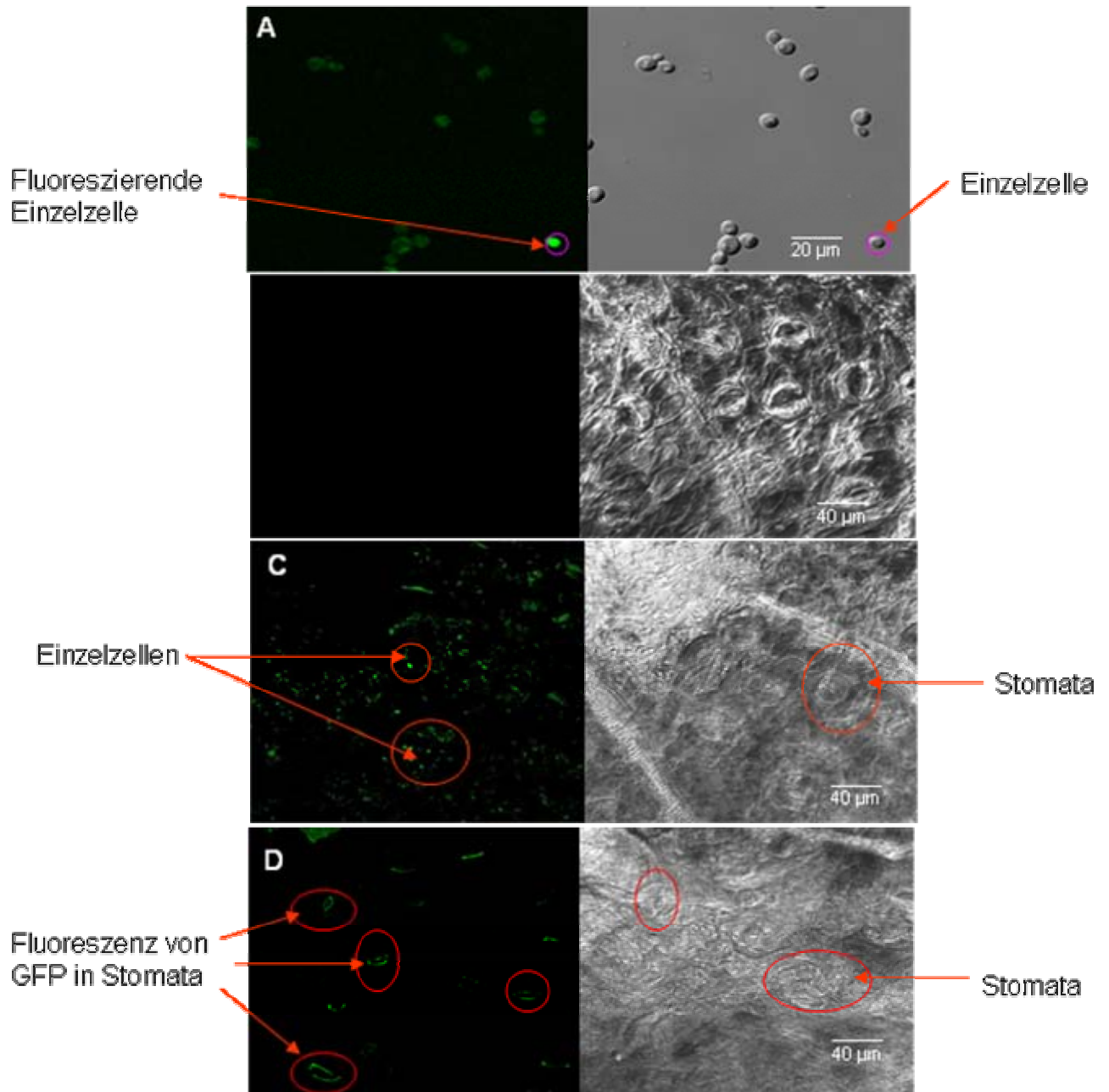
#### **4.4.3. Ergebnisse der Keimungsexperimente mit *Pichia pastoris***

Um die Proteinexpression der rekombinanten *Pichia pastoris* zu testen, wurden die Zellen pPICHS/GFP und pPKHS in methanolhaltigem Medium kultiviert und nach zwei Tagen mikroskopiert. Wie aus der Abbildung B-31A zu ersehen, war GFP gut sichtbar und gleichmäßig in den Zellen verteilt.

Für die Aufklärung der Fragestellung bezüglich der Lokalisierung der Emission von Methanol aus Blättern wurden oberflächensterilisierte Tabaksamen in Gegenwart von *Pichia pastoris* Zellen pPICH5/GFP und pPKHS in Wasser bzw. 1,0 %iger methanolischer Lösung angezogen. Letztere diente als positive Kontrolle.

In allen Kontrollversuchen mit *Pichia pastoris* pPKHS war keine Fluoreszenz zu sehen (Abb. B-31B). *Pichia pastoris* pPICH5/GFP Zellen, die in Gegenwart von externem Methanol auf Tabakkeimlingen wuchsen, waren auf den Blattoberflächen gleichmäßig verteilt und produzierten GFP (Abb. B-31C). An manchen Stellen war festzustellen, dass die Fluoreszenz besonders in Spaltöffnungen sehr stark war.

In der Abbildung B-31D sind die konfokal mikroskopischen Aufnahmen der *Pichia pastoris* pPICH5/GFP Zellen auf gekeimten Tabakblättern, die nur in wässrigem Medium wuchsen, dargestellt. Auch ohne Zugabe von externem Methanol war eine deutliche Fluoreszenz sichtbar. Die Fluoreszenz erschien aber überwiegend um bzw. in den Spaltöffnungen (Abb. B-31D, Kreis). Die Konturen der einzelnen Hefezellen waren jedoch nicht eindeutig erkennbar. Es wurde vermutet, dass sich die Zellen an diesen Stellen überlappten und dabei möglicherweise Biofilme bildeten, die dann keine Identifizierung einzelner Zellen ermöglichten oder, dass das GFP nach Lyse der Zellen freigesetzt wurde. Dennoch zeigten diese Aufnahmen erstmals, dass die Methanolmenge, die die keimenden Tabaksamen über die Blätter freisetzen, ausreichte, um die Expression von GFP in *Pichia pastoris* Zellen zu induzieren. Die Experimente lieferten damit die ersten Hinweise, dass Methanol aus den Spaltöffnungen in die Atmosphäre freigesetzt wird.



**Abb. B-31:** Fluoreszenzaufnahmen von GFP-markierten *Pichia pastoris* pPKHS und pPICHHS/GFP Zellen. (A): In 1,0 %iger methanolhaltiger Lösung angezogene *Pichia pastoris* pPICHHS/GFP Zellen; (B): Kontrollansatz mit *Pichia pastoris* pPKHS Zellen; (C): Grün fluoreszierende Einzelzellen von *Pichia pastoris* pPICHHS/GFP in Gegenwart von externem Methanol auf Tabakkeimblätter; (D): GFP-bedingte Fluoreszenz von *Pichia pastoris* pPICHHS/GFP Zellen in Gegenwart von Wasser mit keimenden Tabakkeimblättern. Graue Bilder zeigen die Phasenkontrastaufnahmen derselben Bildabschnitte.



#### 4.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchungen zur Bestimmung von Methanol bei Keimlingen lieferten zwei wichtige Ergebnisse. Zum einen zeigten sie eindeutig, dass die Methanolproduktion besonders zu Beginn der Keimungsphase am höchsten ist, wobei das Methanol in die umgebende Luft freigesetzt wird. Zum anderen waren die Methylolepten in der Lage das aus keimenden Samen freigesetzte flüchtige Methanol als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Methanol gehört zu den wichtigsten leichtflüchtigen Verbindungen in der Atmosphäre und wird überwiegend bei wachsenden Pflanzen produziert. Der Alkohol entsteht dabei durch die Demethylierung von Pektin mit Hilfe des Enzyms Pektinmethylesterase während der Entwicklung jüngerer Pflanzen (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995; Galbally und Kirstine, 2002; Fall, 2003). Pektin und Pektinmethylesterase wurden in pflanzlichen Zellwänden nachgewiesen (Obendorf *et al.*, 1990).

Für die Quantifizierung der durch Tabakkeimlinge freigesetzten Methanoldmenge wurden zwei verschiedene Analysemethoden herangezogen. Hierbei erwies sich die von Nemecek-Marshall und Mitarbeitern (1995) publizierte Methode mit einer Nachweisgrenze von 0,02 µg/g als weniger empfindlich als die PTR-MS-Technik mit Nachweisgrenzen im ppb-Bereich. Aus keimenden Tabaksamen konnten Konzentrationen von 0,4 bis 0,7 ppbv Methanol bezogen auf ein Gewicht von ca. 120 mg Keimlingen nachgewiesen werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen haben Boschetti und Mitarbeiter aus sechs verschiedenen Beerenpflanzen (Erdbeere, *Fragaria vesca* cv. Elsanta; Himbeere, *Rubus idaeus* cv. Tulameen; Schwarzbeere, *Rubus laciniatus* cv. Lockness; Heidelbeere, *Vaccinium myrtillum* cv. Brigitta blue, rote und weiße Johannisbeere, *Ribes rubrum* cv. Roveda und Blanca) eine durchschnittliche Methanoldmenge von 2,5 ppm bezogen auf 50 g Material mittels PTR-MS ermittelt. Hierbei wurde ebenfalls eine Abnahme der Methanolkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt (Boschetti *et al.*, 2001). Aufgrund der komplexen Mischungsverhältnisse von Substanzen in der Atmosphäre, bietet sich die PTR-MS-Technik als alternative Meßmethode zur selektiven Bestimmung leichtflüchtiger organischer Verbindungen an.

Die Verwendung von Reportergen-Fusionen mit Promotoren, die auf spezielle Umweltreize reagieren, erlaubt die Untersuchung von Analyten mit hoher Selektivität, da die spezifische Antwort nicht von der Verwertung von Substraten, sondern von der Aktivierung spezieller Promotoren abhängig ist. Mit Hilfe von *Pichia pastoris* Zellen, die Konstrukte enthielten, welche GFP unter der Kontrolle eines methanolsensitiven Promotors exprimierten, sind erstmals die Spaltöffnungen als Emissionsorte des Methanols identifiziert worden. Leveau und Lindow (2001) konnten mit Hilfe von Biosensoren die Verfügbarkeit von Zuckern auf Blattoberflächen von Bohnen (*Phaseolus vulgaris* cv. Bush Blue Lake 274) ermitteln. Hierzu wurden Bakterien der Gattung *Erwinia herbicola* mit einem Plasmid transformiert, welches einen für Fruktose und Glukose sensitiven Promotor sowie die Nukleotidsequenz für GFP enthielt. Die mit GFP-markierten *E. herbicola* Zellen fluoreszierten auf der Oberflächen der Bohnenblätter und die Fluoreszenz konnte anschließend quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass GFP auch für die Bestimmung von Methanol in der Phyllosphäre Verwendung finden kann. In Anbetracht der Schwierigkeiten, die bei der Ermittlung von flüchtigen Verbindungen in der Phyllosphäre auftreten, könnte der Ansatz von Reportergenen mit Promotoren einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Ausstoßes flüchtiger Pflanzeninhaltsstoffe leisten. Die Quantifizierung der Methanolemission sollte über die Intensität des GFP-Signals möglich sein.

## C EXPERIMENTALTEIL

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in analysenreiner Qualität von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die für Biotransformationsversuche verwendeten Verbindungen sind in Tabelle C-1 gesondert aufgelistet. Standard Methods Agar (PCA) wurde bei bioMérieux (Nürtingen, Deutschland) erworben. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert.

Die Identifizierung der nachgewiesenen Verbindungen erfolgte anhand authentischer Referenzverbindungen. Neben selbst synthetisierten und isolierten Verbindungen wurden die in der Referenzsammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben herangezogen.

**Tab. C-1:** Für die Biotransformationen eingesetzte Verbindungen.

Verbindung	Vertrieb
Butanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Benzylalkohol	Riedel-de-Haën (Deisenhofen, Deutschland)
Decanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Decansäure	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Dodecanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Dodecansäure	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Heptanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Hexanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
(E)-2-Hexenal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)

Fortsetzung von Tab. C-1

(Z)-3-Hexenal, 50 % Lsg. in Triacetin	Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
R,S-Linalool	Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Nonanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Nonansäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
(E)-2-Nonenal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Octanal	Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
2-Phenylethanol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Undecanal	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)
Undecansäure	Fluka (Deisenhofen, Deutschland)

## 1.2 Enzyme

Die im Rahmen der Methanol-Bestimmung verwendete Alkoholoxidase aus *Pichia pastoris* wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erworben.

## 1.3 Mikroorganismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Lukas Schreiber (Institut für Ökophysiologie, IZMB, Universität Bonn) von Erdbeermaterialien (Blätter, Früchte) isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels 16S rDNA-Analyse. Die pflanzenpathogenen Pilzstämme *Botrytis cinerea* B. c. 2: 92/RB 11; B. c. 3: 93/HRB 2b und B. c. 4: 93/HRB 1b wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau (Veitshöchheim, Deutschland) und der Stamm Nr. 23 B. c. 1: von dem Landwirtschaftszentrum der Bayer AG (Monheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Stämme B. c. 2, B. c. 3 und B. c. 4 sind von Rebenblättern, isoliert worden, während B. c. 1 von Erdbeerblättern gewonnen wurde. Der methylorophe Stamm *Methylobacterium extorquens* ME4 wurde aus Erdbeerblättern isoliert. Die Identifizierung erfolgte am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg und bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). Die Hefestämme *Pichia pastoris*

pPCHIS/GFP und pPKHS wurden von Herrn Mewes Böttner (Organobalance, Berlin) zur Verfügung gestellt.

#### 1.4 Pflanzenmaterial

Für die Identifizierung der flüchtigen Komponenten aus Erdbeerblättern wurden Freilanderdbeeren der Art *Fragaria x ananassa* var. Elsanta, Elvira, Hummy und White Pine verwendet.

Die für die Studien in Abschnitt C 4-2 verwendeten Samensorten sind in der Tabelle C-2 aufgelistet und wurden vom Handel bezogen. Erdbeerkalluskulturen wurden von Frau Dr. Gresser, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, angezogen.

**Tab. C-2:** Für die Keimungsversuche verwendete Samensorten

Samensorte	Botanische Bezeichnung	Herkunftsland
Buschbohnen	<i>Phaseolus vulgare</i>	Deutschland
Erdbeere	<i>Fragaria vesca</i>	Schweiz
Gelbsenf	<i>Sinapis alba</i>	Deutschland
Gerste	<i>Hordeum vulgare</i>	Deutschland
Mais	<i>Zea mays</i>	Deutschland
Markerbsen	<i>Pisum sativum</i>	Deutschland
Möhren	<i>Daucus carota</i>	Deutschland
Tabak	<i>Nicotiana tabacum</i>	Deutschland
Tomaten	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Deutschland
Weizen	<i>Triticum aestivum</i> L.	Deutschland

### **1.5 Adsorptionsmaterial**

Für die Säulenchromatographie an einer Umkehrphase wurde Lichrosprep<sup>®</sup> RP-18-Material (Korngröße 40-63 µm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) und eine Glassäule (2 x 20 cm) eingesetzt.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 100 (Korngröße 0,2–0,5 mm; Merck, Darmstadt, Deutschland) und eine Glassäule (2 x 70 cm bzw. 3 x 50 cm) verwendet.

### **1.6 Membranfiltration**

Sterile Einmalfilter mit 0,2 µm Porengröße wurden zur Entfernung von Bakterien eingesetzt. Zur Abtrennung der Drüsenhaare aus pflanzlicher Matrix kamen Filter mit Porengrößen von 250 µm, 105 µm und 20 µm der Firma Small Parts Inc. (Miami, USA) zum Einsatz.

### **1.7 Dünnschichtchromatographie**

Träger: DC Fertigfolie POLYGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub>; Schichtdicke: 0,20 mm  
(Macherey–Nagel GmbH, Düren, Deutschland)

Detektion: Vanillin/Schwefelsäure

2 g Vanillin und 2 g konzentrierte Schwefelsäure wurden mit 96 %igem Ethanol auf 250 ml aufgefüllt. Die besprühte Platte wurde 10 min bei 100°C erhitzt.

## 2 Geräte

### 2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

<b>HPLC 1:</b>	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf und Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Berlin, Deutschland)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer)
Mischkammer:	Dynamische Mischkammer (Knauer)
Autosampler:	Basic Marathon (Spark, Emmen, Holland)
Injektor:	Rheodyne 4-Wege-Ventil Nr. 7125, Probenschleife 200 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 x 4,6 mm ; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 1,0 ml/min
Gradient:	0-10 min: 5-20 % B; 10-30 min: 20-100 % B
Detektor:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer)

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-kompatiblen Personal-Computer und der Software „Eurochrom 2000“ (Knauer)

<b>HPLC 2:</b>	Analytische HPLC von Gilson Abimed (Abimed, Lagenfeld, Deutschland)
Pumpen:	2 x Gilson Abimed Pumpen Model 303 mit analytischem Pumpenkopf
Injektor:	Gilson Abimed Sample Injektor Model 231, Probenschleife 200 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 x 4,6 mm ; 5 µm) (Knauer)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril Fluss: 0,7 ml/min
Gradient:	0-10 min: 5-20 % B; 10-30 min: 20-100 % B
Detektor:	UV-Spektralphotometer mit analytischer Messzelle (10 mm)

Die Steuerung und Datenverarbeitung erfolgten mit der Software „*Gilson 712 HPLC Controler, Version 1.02*“.

## 2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

### System 1:

**CG:** Fisons Instruments GC 8000 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C

Autosampler: Fisons AS 800

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 220 °C

Trennsäule 1: J&W DB-Wax (30 m x 0,25 mm,  $d_f = 0,25 \mu\text{m}$ )

Temp.programm 1: 50 °C/3 min//4 °C/min//240 °C/10 min

Trennsäule 2: J&W DB-5 (30 m x 0,25 mm,  $d_f = 0,25 \mu\text{m}$ )

Temp.programm 2: 60 °C/3 min//5 °C/min//300 °C/10 min

Trennsäule 3: OV 1701 (30 m x 0,25 mm,  $d_f = 0,25 \mu\text{m}$ )

Temp.programm 3: 50 °C/1 min//4 °C/min//240 °C/5 min

Trägergas: 3,0 ml/min Helium 5.0

**MS:** Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)

Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV

Temperatur: Ionenquelle 230 °C, Interface 240 °C

Quellendruck: 1 mPa

Multipliiert: 350 V

Massenbereich 1: 40–250 u („*low mass*“)

Massenbereich 2: 50–480 u („*high mass*“)

Massenbereich 3: 35–480 u

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-kompatiblen Personal-Computer und der Software „*Mass-Lab for Windows*“ bzw. „*X-Calibur*“.



### System 2:

**GC:** Fisons Instruments GC 8000<sup>Top</sup>-Voyager (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)  
Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:10), Temperatur 250 °C  
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 220 °C  
Trennsäule : J&W DB-WAXETR (30 m x 0,25 mm, d<sub>f</sub> = 0,25 µm)  
Temp.programm: 40 °C/5 min//4 °C/min//240 °C/25 min  
Trägergas: Helium 75 kPa

**MS:** Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)  
Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV  
Temperatur: Ionenquelle 200 °C, Interface 240 °C  
Quellendruck: 1 mPa  
Multipliiert: 350 V  
Scanbereich: 25–350 u

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-kompatiblen Personal-Computer und der Software „*Mass-Lab for Windows*“.

### System 3:

**GC:** Thermo Finnigan Trace GC 2000 ultra (Thermo Finnigan, Egelsbach, Deutschland)  
Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:10), Temperatur 250 °C  
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 220 °C  
Trennsäule : BPX5 (30 m x 0,25 mm, d<sub>f</sub> = 0,25 µm)  
Temp.programm: 40 °C/3 min//5 °C/min//300 °C/10 min  
Trägergas: Helium 100 kPa

**MS:** Thermo Finnigan Trace DQS (Thermo Finnigan, Egelsbach, Deutschland)  
Ionisation: Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV  
Temperatur: Ionenquelle 200 °C, Interface 280 °C  
Quellendruck: 1 mPa  
Multipliiert: 350 V  
Scanbereich: 50–650 u

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem DELL-kompatiblen Personal-Computer und der Software „*X-Calibur 1.4*“.

### **2.3 Multidimensionale Gaschromatographie mit Moving-Column-Stream Switching-System (MDGC-MCSS)**

**GC:** Fisons Instruments GC 8000 Series (8160 und 8130; ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)  
Injektor: Split/Splitless-Injektor (1:10), Temperatur 230 °C  
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250 °C  
Trennsäulen : Vorsäule in Ofen 1: J&W DB-Wax (30 m x 0,25 mm,  $d_f=0,25 \mu\text{m}$ )  
Hauptsäule in Ofen 2: GC-Säulen mit chiraler Phase  
Temp.programme: Ofen 1: 100 °C//10 °C/min//240 °C/10 min  
Ofen 2: 100 °C/14-25 min//2 °C/min//200 °C

MCSS-System mit Glasdom (desaktiviert, inert) in Ofen 1 zwischen Vorsäule und Hauptsäule

Trärgas: Helium 5.0  
Brenngase: 70 kPa Wasserstoff, 130 kPa Luft, 175 kPa Stickstoff

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-kompatiblen Personal-Computer und der Software „*Chrom-Card for Windows*“.

**GC-Säulen mit chiraler Phase:**

**Chiral 1:** 30 % 2,3-Diethyl-6-*tert.*-butyl-dimethylsilyl- $\beta$ -cyclodextrin in PS 086 (25 m x 0,25 mm,  $d_f = 0,15 \mu\text{m}$ )

**Chiral 2:** 30 % 2,3-Diacetyl-6-*tert.*-butyl-dimethylsilyl- $\beta$ -cyclodextrin in OV 1701 (25 m x 0,25 mm,  $d_f = 0,15 \mu\text{m}$ )

**2.4 Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)**

Gerät: PTR-MS (Ionicon Analytik GmbH, Innsbruck, Österreich)

**Tab. C-3:** Relevante Parameter des benutzten PTR-MS-Systems

Spannung in der Driftröhre	600 V
Wasserfluss	12 sccm/min
Bypass PC	600 hPa
SEV-Spannung	3350 V
Temperatur Einlass	50 °C
Temperatur Driftröhre	50 °C
Druck in der Driftröhre	2 hPa
Druck in der Detektion	$2 \cdot 10^{-5}$ hPa
Transmission M21 ( $\text{H}_3\text{O}^+$ -Isotop)	0,433
Transmission M33 (Methanol protoniert)	0,620
Reaktionszeit t	$1,05 \cdot 10^{-4}$ sec
Reaktionskonstante k	$2,00 \cdot 10^{-9}$ cm <sup>3</sup> /sec

## **2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AV-360 ( $^1\text{H}$ -NMR 360 MHz, Bruker, Bremen) und einem Bruker AMX 400-III ( $^{13}\text{C}$ -NMR, 400 MHz) mit Trimethylsilan (TMS) als internem Standard aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wurde in parts per milion (ppm) relativ zum Lösungsmittelsignal ( $\text{CDCl}_3$ ;  $^1\text{H}$ -NMR: 7.27 ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR: 77.0 ppm) oder unter Verwendung des Standards (0.00 ppm) angegeben. Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

## **2.6 Mikroskopische Analysen**

### **2.6.1 Lichtmikroskopie**

Die Sichtbarmachung der an Blattoberflächen lebenden Mikroorganismen erfolgte unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen Acridine Orange oder 4,6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI) und wurde mit Hilfe des ZEISS Epifluoreszenz-Mikroskops Axioplan (Jena, Deutschland) kombiniert mit der Farbvideokamera Seescan colour 100 C (Intas) durchgeführt.

### **2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Die Bilder der Erdbeerblattoberflächen wurden mit dem ZEISS Digital Scanning Microscope DSM962 (Jena, Deutschland) zusammen mit einem Mitsubishi Video Copy Processor aufgenommen.

### 2.6.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Gerät: Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg).

Folgende Parameter wurden am Gerät voreingestellt:

- Anregungswellenlänge: 488 nm
- Emissionswellenlänge: 530 nm
- Gain PMT-2: 530 V
- Hauptlaser: 30 %
- Pinhole: 1,20

Die Dokumentation der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera C5985 (Hamamatsu, Herrsching) und eine anschließende Bildbearbeitung mit dem mitgelieferten Softwarepaket ARGUS20/HPD-CP (Version 1.5).

### 2.7 Schüttelinkubatoren

Gerät 1: GFL 3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)

Gerät 2: Infors HT (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

Temperatur: 30 °C

Schüttel-

geschwindigkeit: 120 und 180 rpm

### 2.8 Autoklav

Gerät 1: Wolf Sanoclav, Typ S-MCS (Wolf, Geisslingen, Deutschland)

Gerät 2: Zirbus Technology, Typ HAST 4-5-7 (Bad Grund, Deutschland)

Temperatur: 121 °C

Autoklavierzeit: 20 min

## 2.9 Sonstige Geräte

Sterile Werkbänke: 1. Laminar Airflow Bench, Modell-Nr. NU440600E (NuAire Inc. Plymouth, MN, USA)

2. Waldner Electronics, Typ FAZ 3 (Wangen, Deutschland)

Kühlzentrifugen: 1. Centrikon T-124, Kontron Instruments (Italien);  
Rotor: A 8.24 und A. 6.14 Sorvall RC-5B (DuPont Instruments, Wilmington, USA).

2. Sigma Laboratory Centrifuges 4K 15C (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland)

Lyophilisator: Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode, Deutschland)

pH-Meter: pH-Meter CG 820 (Schott Geräte, Hofheim)

Waagen: 1. Mettler PI 300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)

2. Sartorius BP 210 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Ultraschallbäder: Branson Sonifier Model S 125 (Branson, Danbury, USA)

Bandelin Sonorex TK 52

## 2.11 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung wurde mit dem SigmaPlot-Programm, Version 8.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkarth, Deutschland) durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten wurden mit dem T-TEST (Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ ) bestimmt und durch entsprechende Buchstaben in den Diagrammen kenntlich gemacht.

### 3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### 3.1 Pufferherstellung

Die Herstellung von 0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8) erfolgte durch Mischen von 88 ml 0,2 M Di-Kaliumhydrogenphosphat- und 12 ml 0,2 M Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösungen.

#### 3.2 Herstellung der Wachstumsmedien

Zur Anzucht der Bakterienkulturen wurde ein Minimalmedium nach Dworkin (Dworkin und Forster, 1967) verwendet (Tab. C-4).

**Tab. C-4:** Zusammensetzung des Minimalmediums nach Dworkin

Substanz	Formel	Menge <sup>a</sup>
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,0 g
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4$	0,2 g

<sup>a</sup> Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1000 ml dest. Wasser (pH 6,8)

Jeder Ansatz wurde vor dem Autoklavieren mit 5 ml/l einer Spurenelementlösung (Atlas und Parks, 1993) versetzt (Tab. C-5).

**Tab. C-5:** Zusammensetzung der Pseudomonas-Spurenelementlösung

Substanz	Formel	Menge <sup>a</sup>
Borsäure	$\text{H}_3\text{BO}_3$	232 mg (3,7 mmol)
Eisensulfat-Heptahydrat	$\text{Fe(II)SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	180 mg (0,065 mmol)
Zinksulfat-Heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	174 mg (6,0 mmol)
Cobaltsulfat-Heptahydrat	$\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	96 mg (0,34 mmol)

Fortsetzung Tab. C-5

Ammoniummolybdat	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	22 mg (0,019mmol)
Kupfersulfat-Pentahydrat	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	8 mg (0,03 mmol)
Mangansulfat-Tetrahydrat	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	6 mg (0,035 mmol)

<sup>a</sup> Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1000 ml dest. Wasser.

Nach dem Autoklavieren (121 °C, 20 min) wurde dem Medium 5,0 g/l Glukose in Form einer 50 %igen sterilen Glukoselösung zugegeben. Die Zugabe erfolgte erst nach der Sterilisation des Mediums, um unerwünschte chemische Reaktionen wie z.B. die Maillard-Reaktion zu vermeiden. Damit konnte eine Veränderung der ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse sowie eine Bräunung des Mediums unterbunden werden.

### 3.3 Weitere Nährmedien

#### 3.3.1 Plate Count Agar (PCA) (Agar für epiphyllle Bakterien)

Zusammensetzung:	bio-Trycase	5 g/l
	Hefe-Extrakt	2,5 g/l
	Glukose	1 g/l
	Agar	15 g/l
	pH-Wert	7,0

#### 3.3.2 Malzextrakt-Agar (Agar für Botrytis cinerea)

Zusammensetzung:	Malz-Extrakt	30 g/l
	Pepton	5 g/l
	Agar	15 g/l
	pH-Wert	5,4 ± 0,2



### 3.3.3 M9-Methanol-Medium (Selektivmedium für Methylotrophen)

Zusammensetzung:	M9 Minimal Salts	11,28 g/l
	Methanol	5,0 ml/l
Für Platten	Agar	15 g/l

### 3.3.4 Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Medium für Hefestämme)

Zusammensetzung:	Hefeextrakt	1 %
	Pepton	2 %
	Glukose	2 %
Für Platten	Agar	2 %

Die hergestellten Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Vor der Animpfung mit Bakterien- bzw. Hefezellen wurden die Medien autoklaviert (121 °C, 20 min).

## 3.4 Untersuchungen an Erdbeerblättern

### 3.4.1 Oberflächendarstellung im Rasterelektronenmikroskop

Erdbeerblätter wurden zunächst klein geschnitten und anschließend für zwölf Stunden in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus 6,25 % Glutaraldehyd, 2 % Paraformaldehyd und 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) bei 4 °C fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Pufferlösung sind die Blattstücke stufenweise bei Raumtemperatur mit Aceton bis zu 100 % entwässert worden. Nach der Entwässerung wurden die Blattstücke mittels Kritisch-Punkt-Trocknung mit CO<sub>2</sub> getrocknet und die Präparate vor dem Mikroskopieren mit Platin/Palladium beschichtet. Die Bilder wurden mit dem ZEISS Digital Scanning Microscope DSM962 (Jena, Deutschland) zusammen mit einem Mitsubishi Video Copy Processor aufgenommen.

### **3.4.2 Isolierung der Drüsenhaare und Identifizierung ihrer Inhaltsstoffe**

Die Erdbeerblätter wurden zunächst mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um Staub und anhaftende kleine Partikel zu entfernen. Der Alkohol ist anschließend mit Leitungswasser ausgespült worden. Die gewaschenen Blätter (10-15 g) wurden in einem 500 ml-Rundkolben überführt, in dem 200 ml Trennlösung (0,4 M Mannitol und 50 mM Natriumascorbat, pH 6,8), 10 g Quarzsand und 10 g Glaskügelchen (0,5 mm Durchmesser; Roth, Karlsruhe, Deutschland) vorgelegt worden waren. Der Kolben wurde 30 Minuten geschüttelt, wobei die Geschwindigkeit der Schüttelmaschine so eingestellt wurde, dass sich die Trennlösung, die Glaskügelchen, der Sand und die Blattstücke gut durchmischten. Nach der Schüttelphase sind die in der Lösung abgerissenen Teile durch Filter mit Porengrößen 250 µm, 105 µm und 20 µm abgetrennt worden. Die Drüsenhaare wurden auf dem Filter mit Porengröße 20 µm gesammelt und anschließend zur Kontrolle mikroskopiert.

Zur Identifizierung der flüchtigen Komponenten sind die erhaltenen Drüsenhaare mehrmals mit der Trennlösung gewaschen und in einen 50 ml-Rundkolben überführt worden. Die Drüsenhaare wurden danach dreimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Diethylether-Fractionen wurden an einer Vigreux-Kolonne (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml eingengt. Der Extrakt mit den flüchtigen Komponenten ist mittels GC-MS analysiert worden.

### **3.4.3 Bestimmung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter**

Zur Isolierung flüchtiger Komponenten aus Erdbeerblättern wurden drei verschiedene Methoden verwendet.

#### **3.4.3.1 Tauchen der Blätter in Diethylether**

Frische Erdbeerblattspreiten (5-10 g) wurden in 100 ml Diethylether eingelegt und nach etwa 30-60 Sekunden aus der Lösung wieder entfernt. Die Diethyletherlösung wurde filtriert und an einer Vigreux-Kolonne (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml eingengt. Der erhaltene Extrakt ist mittels GC-MS analysiert worden.

### **3.4.3.2 Homogenisieren**

Blätter (5-10 g) von im Freiland und im Gewächshaus angezogenen Erdbeerpflanzen wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax mit 50 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 20 Minuten (9000 rpm, 4 °C) zentrifugiert und der wässrige Überstand dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und an einer Vigreux-Kolonnen (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml eingengt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mittels GC-MS.

### **3.4.3.3 Kopfraum-Analyse (Headspace-Analyse)**

Die flüchtigen Verbindungen von fünf frischen Erdbeerblättern wurden bei 40 °C mit einem Stickstoffstrom (40 ml/min) ausgetrieben, an Tenax TA (Ringoos, NJ) für eine Stunde adsorbiert und anschließend mittels GC-MS nach Thermodesorption analysiert. Die Tenax Kartusche wurde an eine Turbomatrix ATD (Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland) montiert, die mit einer GC-MS MD 1000 (Fisons, Bremen, Deutschland) verbunden war.

### **3.4.4 Isolierung und Charakterisierung von Methyloprophen**

Zur Isolierung von methyloprophen Bakterien, den so genannten PPFM (Pink-Pigmented Facultative Methyloprophs), wurden Erdbeerblattober- und unterseiten auf dem im Abschnitt C-3.3.3 beschriebenen selektiven Medium abgedrückt (Holland, 1997). Die Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf bis sieben Tagen wurden aus den gebildeten Kolonien einzelne pinkfarbene Kolonien mit Hilfe einer Impföse gepickt und auf neue Methanol-Selektiv-Agarplatten ausgestrichen. Nach erneuter Inkubation, wurden die Reinkulturen mittels 16S rRNA-Analyse genotypisch charakterisiert.

### **3.5 Interaktionsstudien**

#### **3.5.1 Metabolisierung der flüchtigen Verbindungen der Erdbeerblattoberflächen durch epiphyllie Bakterien**

##### **3.5.1.1 Vorinkubation**

Für die Metabolisierungsversuche wurden 75 ml Flüssigmedium nach Dworkin mit 375 µl Spurenelementlösung in einem 300ml-Erlenmeyerkolben versetzt und das Gefäß mit einem 100 ml-Becherglas verschlossen. Nach dem Autoklavieren ist jeder Kultur  $\beta$ -Glukose in einer Konzentration von 5 g/l zugesetzt worden. Zum Beimpfen wurde das Bakterienmaterial von frisch angewachsenen Platten mit Hilfe einer Impföse in die Gefäße überführt. Im Schüttelinkubator (30 °C, 120 rpm) sind die Ansätze für 24 Stunden vorinkubiert worden.

##### **3.5.1.2 Substratzugabe und Inkubationsphase**

Nach Beendigung der Vorinkubationsphase wurden jedem Ansatz 50 µl der jeweiligen flüchtigen Verbindung direkt zugegeben. Danach wurde die Inkubation unter gleichen Bedingungen für weitere 72 Stunden fortgesetzt.

##### **3.5.1.3 Aufarbeitung der Umsetzungen und Identifizierung gebildeter Produkte**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze zunächst fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Bakterienzellwände aufzubrechen und eventuell intrazellulär vorliegende Produkte freizusetzen. Anschließend sind die Kulturlösungen im Scheidetrichter dreimal mit je 40 ml Diethylether extrahiert worden. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und an der Vigreux-Kolonnen (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml reduziert. Zur Identifizierung der gebildeten Produkte wurden die Extrakte mittels GC-MS analysiert und zur Quantifizierung wurde 0,1 % (v/v) Geraniol als interner Standard zugesetzt. In der gleichen Weise wurden Kontrollansätze ohne Bakterien durchgeführt.

### 3.5.2 Biotransformation von C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> Aldehyden durch *Bacillus megaterium*

Für den Nachweis von Aldolkondensationsprodukten, die bei der Biotransformation der aliphatischen Aldehyde Octanal, Decanal, Undecanal und Dodecanal durch *Bacillus megaterium* (Isolat I29) entstehen, wurde analog zu den Metabolisierungsversuchen (C-3.5.1) das Bakterium mit den Aldehyden inkubiert. Die Vorinkubation dauerte allerdings in diesem Versuch 72 Stunden, damit die Aldehyde später als alleinige Kohlenstoffquellen bei der Inkubation fungieren konnten. Nach Beendigung der Vorinkubationsphase wurden den Kulturlösungen 50 µl der jeweiligen Aldehyde zugegeben. Die Inkubation ist für weitere sieben bis zehn Tage fortgesetzt worden, um eine komplette Umsetzung der Aldehyde zu erreichen. Nach der Inkubation wurde wie unter C-3.5.3 beschrieben, weiter verfahren.

Zusätzlich wurden Zeitversuche hinsichtlich der Konzentrationen der während der Biotransformationsexperimente gebildeten Aldolkondensationsprodukte durchgeführt. Dazu wurde Nonanal mit *Bacillus megaterium* für drei Wochen inkubiert. Nach jedem dritten Tag wurde ein Aliquot entnommen und dreimal mit je 40 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und an einer Vigreux-Kolonnen (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml reduziert. Zur Identifizierung der gebildeten Produkte wurden die Extrakte mittels GC-MS analysiert und zur Quantifizierung ist 0,1 % (v/v) Geraniol als interner Standard eingesetzt worden. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Bakterien.

### 3.5.3 Darstellung der Aldolkondensationsprodukte (Acroleinderivate)

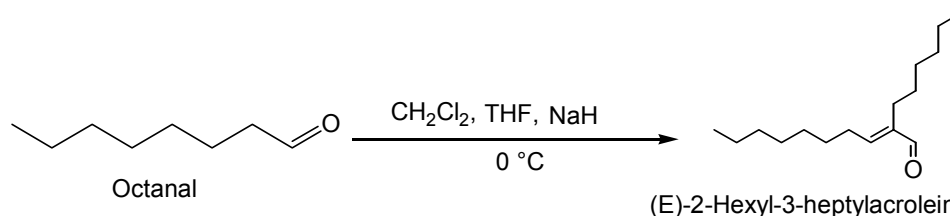
Die Darstellung der Acroleinderivate erfolgte gemäß einer modifizierten Methode von Yung-Son Hon und Mitarbeiter (1995).

Zehn mmol Nonanal wurden in einen 250 ml-Rundkolben pipettiert, in dem 25 ml Dichlormethan und 25 ml Tetrahydrofuran (THF) vorgelegt worden sind. Nach Zugabe von 50 mg Natriumhydrid wurde 24 Stunden bei 0 °C gerührt. Der Ansatz ist mit 5 N Salzsäure angesäuert und zweimal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert worden. Die organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 ml destilliertem Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer (40 °C) bei

Atmosphärendruck vom Lösungsmittel befreit. Die Kontrolle des Reaktionsverlaufes erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und GC-MS.

Zur Isolierung der gesuchten Verbindung wurde der Rückstand mittels Säulen- chromatographie an Kieselgel mit einer Mischung aus Pentan/Diethylether (9:1; v/v) aufgereinigt. Die erhaltenen 25ml-Fractionen wurden mittels GC-MS kontrolliert. Die Fractionen mit dem gesuchten Produkt wurden vereinigt und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie von Nebenprodukten befreit. Die erhaltenen Acrolein- derivate sind mittels MS und NMR charakterisiert worden.

***(E)-2-Hexyl-3-heptylacrolein***

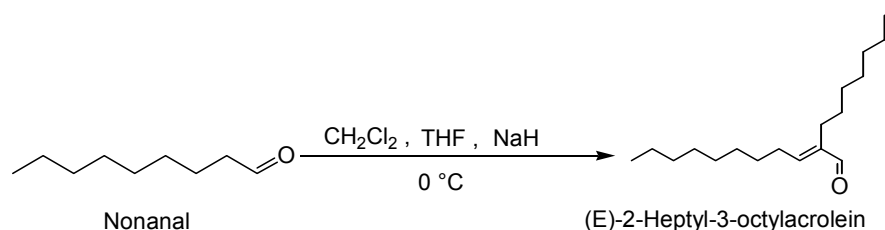


**GC-EI-MS (70 eV):** m/z (%) 238 ( $M^+$ , 80), 223 (4), 195 (4), 177 (4), 167 (48), 153 (40), 139 (100), 121 (14), 109 (16), 95 (92), 83 (74), 69 (62), 55 (68).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):**  $\delta$  0,86-0,89 (m, 6H), 1,25-1,51 (m, 18H), 2,23 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,35 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 6,42 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 9,36 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  14,08, 22,64, 24,02, 28,69, 28,77, 28,93, 29,24, 29,27, 29,38, 29,41, 29,48, 29,68, 31,86, 143,84 (C=C), 155,36 (C=C), 195,36 (C=O).

**(E)-2-Heptyl-3-octylacrolein**

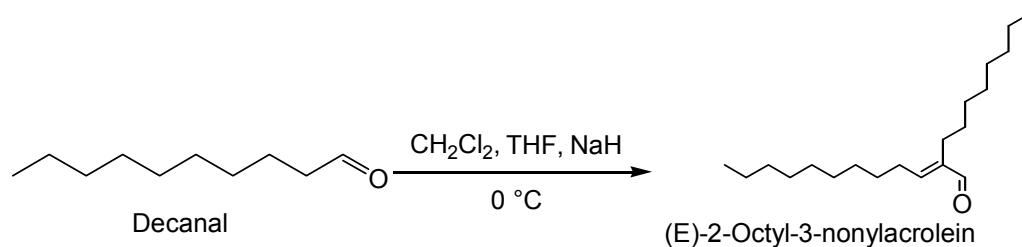


**GC-EI-MS (70 eV):** m/z (%) 266 ( $M^+$ , 55), 209 (10), 181 (40), 167 (40), 153 (87), 135 (25), 109 (65), 97 (70), 83 (87), 67 (66), 55 (100), 41 (87).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):**  $\delta$  0,86-0,92 (m, 6H), 1,23-1,32 (m, 22H), 2,25 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,38 (q,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 6,46 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 9,39 (s, 1H)

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  14,08, 22,64, 24,05, 28,71, 28,80, 28,95, 29,12, 29,15, 29,20, 29,30, 29,38, 29,41, 29,65, 31,82, 31,84, 143,89 (C=C), 155,30 (C=C), 195,33 (C=O).

**(E)-2-Octyl-3-nonylacrolein**

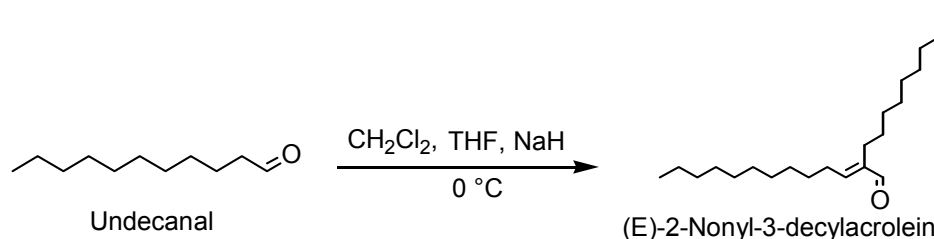


**GC-EI-MS (70 eV):** m/z (%) 294 ( $M^+$ , 34), 223 (9), 195 (28), 181 (31), 167 (56), 149 (16), 123 (31), 97 (69), 83 (81), 55(100), 41 (84).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):**  $\delta$  0,86-0,90 (m, 6H), 1,26-1,51 (m, 26H), 2,20 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 2,31 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 6,41 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 9,30 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  14.09, 22.67, 24.02, 28.68, 28.80, 28.93, 29.30, 29.38, 29.41, 29.47, 29.52, 29.54, 29.57, 29.67, 30.30, 31.88, 32.05, 143.82 (C=C), 155.40 (C=C), 195.38 (C=O).

**(E)-2-Nonyl-3-decylolefin**

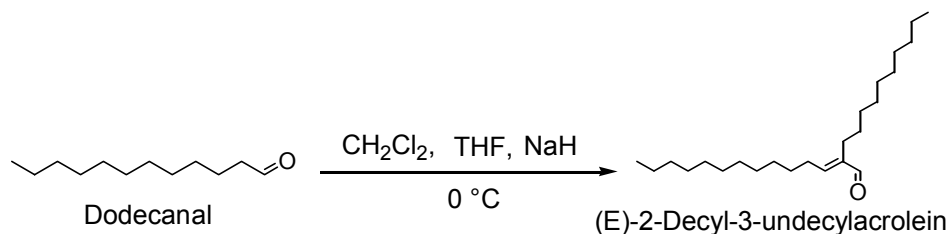


**HRGC-EI-MS (70 eV):** m/z (%) 322 ( $M^+$ , 76), 237 (12), 195 (45), 181 (82), 163 (12), 137 (27), 111 (36), 95 (72), 83 (79), 67 (61), 55 (94), 43 (100).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):**  $\delta$  0,85-0,89 (m, 6H), 1,26-1,33 (m, 30H), 2,20 (t,  $J = 8,1$  Hz, 2H), 2,31 (q,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 6,41 (t,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 9,35 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  14,06, 22,65, 24,01, 28,63, 28,73, 28,81, 28,92, 29,29, 29,34, 29,38, 29,40, 29,44, 29,49, 29,53, 29,58, 29,67, 30,28, 31,63, 31,72, 143,82 (C=C), 155,40 (C=C), 195,38 (C=O).

**(E)-2-Decyl-3-undecylolefin**



**GC-EI-MS (70 eV):** m/z (%) 350 ( $M^+$ , 61), 314 (7), 251 (9), 233 (15), 223 (27), 209 (36), 195 (62), 165 (16), 135 (18), 121 (30), 109 (36), 95 (70), 83 (69), 69 (60), 55 (88), 43 (100).

**$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):**  $\delta$  0,86-0,90 (m, 6H), 1,25-1,51 (m, 34H), 2,23 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 2,35 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 6,42 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 9,35 (s, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$  14,10, 22,67, 24,01, 28,63, 28,68, 28,77, 28,81, 28,93, 29,33, 29,38, 29,41, 29,43, 29,49, 29,52, 29,58, 29,60, 29,62, 29,67, 31,63, 31,72, 31,89, 143,82 (C=C), 155,40 (C=C), 195,38 (C=O).



### **3.5.4 Inhibierungsversuche von *Botrytis cinerea* durch epiphyllle Bakterien**

Zunächst wurden die epiphyllen Bakterien gemäß C-3.2 kultiviert. Malzextrakt-Agarplatten (MEA) wurden gemäß C-3.3.2 hergestellt und 1 ml einer 0,85 %igen Natriumchloridlösung von *Botrytis cinerea* Myzel gleichmäßig darauf verteilt. Zwei Löcher (1 cm Durchmesser) sind in den Agarplatten mit Hilfe eines Bohrers gestochen worden. Je 100 µl reiner Bakterienkulturlösungen ( $2 \times 10^6$  CFU/ml), steriler Kulturüberstände bzw. Acetonextrakte der Kulturrückstände wurden in die Löcher einpipettiert. Die Platten sind vorsichtig mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur inkubiert worden. Nach sieben Tagen wurden die Durchmesser der gebildeten Hemmhöfe gemessen. Als Kontrolle wurde steriles destilliertes Wasser verwendet.

Sterile Kulturüberstände wurden nach Zentrifugation der Kulturlösungen (9000 rpm, 25 Minuten, 4 °C) und anschließendem Filtrieren des erhaltenen Überstandes über 0,2 µm Sterilfilter gewonnen. Der erhaltene Rückstand wurde einer Acetonbehandlung unterzogen. Dazu wurde das Bakterienpellet mit 25 ml Aceton und Glaskügelchen gemischt und am Vortexer stark geschüttelt. Die Acetonlösung ist anschließend filtriert, am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von 1 ml reduziert und für den Hemmtest eingesetzt worden.

### **3.5.5 Untersuchungen zur Wirkung flüchtiger Komponenten der Erdbeerblätter auf *Botrytis cinerea* und epiphyllen Bakterien**

Zur Prüfung des Effekts flüchtiger Erdbeerblattinhaltsstoffe auf das Wachstum von *Botrytis cinerea* und epiphyllen Bakterien wurde ein Petrischalen-Test durchgeführt. MEA Medien, die mit Benzylalkohol-, Hexanal-, (E)-2-Hexenal-, (Z)-3-Hexenal-, Nonanal-, (E)-2-Nonenal-, R,S-Linalool- und 2-Phenylethanol-Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1000 ppm enthielten, wurden hergestellt. Die Platten sind in der Mitte mit einem Pilzgeflecht (5-7 mm Durchmesser) bzw. 100 µl Bakteriensuspension ( $2 \times 10^6$  CFU/ml), die in ein gestanztes Loch einpipettiert wurden, inokuliert worden. Vorsichtig wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sieben Tagen wurden die Durchmesser der gebildeten Kolonien gemessen. Kontrollansätze erfolgten ohne den Zusatz von flüchtigen Komponenten.

### **3.5.6 Inhibierungsversuche von *Botrytis cinerea* durch epiphyllie Bakterien in Gegenwart flüchtiger Verbindungen der Erdbeerblätter**

Epiphyllie Bakterien und *Botrytis cinerea* wurden in Gegenwart verschiedener flüchtiger Komponenten (Benzylalkohol, R,S-Linalool, Hexanal, (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexenal, Nonanal, (E)-2-Nonenal und 2-Phenylethanol) auf MEA Platten inokuliert. Die Platten wurden gemäß C-3.5.4 hergestellt, jedoch mit Konzentrationen von 1, 5, und 10 ppm der flüchtigen Verbindungen. Das Pilzgeflecht und die Bakterienkultursuspensionen wurden auf dem Agar so gelegt bzw. einpipettiert, dass der Abstand zwischen dem Pilz und dem Loch 55 mm betrug. Die Radien der gewachsenen Kolonien bzw. Pilzgeflechte wurden täglich gemessen. Als Kontrollen wurden *Botrytis cinerea* mit 100 µl destilliertem Wasser und bakterielle Kultursuspension ohne den Pilz verwendet.

## **4 *Methylobacterium extorquens* und Pflanzenwachstum**

### **4.1 Sterilisieren von Samen**

Die Samen wurden vor der Inokulation mit *Methylobacterium extorquens* ME4 mit Natriumhypochloritlösung (NaOCl, 12 % Chlor) oberflächensterilisiert. Dazu wurden die Samen mit einer 50 %igen verdünnten NaOCl-Lösung gemischt und 30 Minuten langsam geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die Sterilisationslösung entfernt und die Samen mehrmals mit sterilem destilliertem Wasser von Chlorid-Ionen freigewaschen. Die sterilen Samen wurden anschließend für die Wachstumsexperimente verwendet.

### **4.2 Keimungsexperimente**

Der Einfluss von *Methylobacterium extorquens* ME4 auf die Keimung der in der Tabelle C-2 aufgelisteten Samensorten wurde untersucht. Unter sterilen Bedingungen wurden je vier Rundfilter in Petrischalen vorgelegt und mit 4 ml destilliertem Wasser befeuchtet. Dazu wurde 1 ml einer *Methylobacterium extorquens* ME4 Kulturlösung ( $10^6$  CFU/ml) gegeben und die oberflächensterilisierten Samen auf den feuchten Papieren mit Hilfe eines feinen sterilen Spatels verteilt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Tageslänge von 16 Stunden und eine Lichtversorgung von ca. 7000 lx zu gewährleisten, erfolgte eine Zusatzbeleuchtung mit Natriumdampfleuchten (Philips TLD 36W/840). Nach der Keimung der Samen und Bildung der Blätter wurden Biomassenstudien durchgeführt. Dabei wurden die Keimlinge gewogen und die Stängellänge gemessen. Zum Vergleich wurden analog zu den mit *Methylobacterium extorquens* ME4 infizierten Samen Kontrollexperimente ohne Bakterien durchgeführt.

#### **4.3 Extraktion und Analyse der *Methylobacterium extorquens* Kulturlösung**

Die Kulturlösung von *Methylobacterium extorquens* ME4 wurde nach Zentrifugation (4000 rpm, 25 min, 4 °C) und steriler Filtration mittels Festphasenextraktion an RP-18-Kartuschen, die zuvor mit 5 ml Methanol und 5 ml destilliertem Wasser konditioniert worden waren, extrahiert. Nach der Probenaufgabe, wurden die Kartuschen mit 10 ml Methanol eluiert, welches am Rotationsverdampfer entfernt wurde. Nach Zugabe von 1 ml sterilem destilliertem Wasser wurden Aliquote (500 µl) in Keimungsversuchen eingesetzt.

Zur Isolierung möglicher wachstumsfördernder Verbindungen wurde die wässrige Lösung durch präparative HPLC (HPLC 2) fraktioniert (3 ml/Fraktion). Die erhaltenen Fraktionen (10) wurden am Rotationsverdampfer vom Fließmittelgemisch befreit und die Rückstände in sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Die wässrigen Fraktionen wurden erneut mittels HPLC analysiert und für die Keimungsversuche verwendet.

#### **4.4 Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf das Wachstum von Tabaksamen**

Zur Prüfung der Wirkung von Vitamin B<sub>12</sub> auf das Wachstum von keimenden Tabaksamen, sind die Samen mit Natriumhypochloritlösung (NaOCl, 12 % Chlor) oberflächensterilisiert worden. Nach Behandlung mit steril verdünnten Vitamin B<sub>12</sub>-Lösungen [0,1 bis 0,0001 % (v/v)] wurden die Samen in Petrischalen zur Keimung gebracht (vgl. Abschnitt C-4.2). Nach der Keimung der Samen und Bildung der Blätter wurden Biomassenstudien durchgeführt. Dabei wurden die Keimlinge gewogen und die Stängellänge gemessen.

#### 4.5 Interaktion von *Methylobacterium extorquens* mit Erdbeerkalluskulturen

Für die Interaktion von *Methylobacterium extorquens* ME4 mit sterilen Erdbeerkalluskulturen wurde die angelegte bakterielle Flüssigkultur verwendet. Erdbeerkalluskulturen sind von Frau Dr. Gresser, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg, angezogen worden. Erdbeerkalluskulturen wurden mit *Methylobacterium extorquens* ( $10^7$  CFU/ml) in Petrischalen inokuliert und anschließend mit Parafilm verschlossen. Als Kontrolle diente eine Kalluskultur ohne Kontamination mit *Methylobacterium extorquens*. Nach 14 Tagen wurden die Kalluskulturen mittels eines Ultra-Turrax mit 30 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Nach Zentrifugation des Homogenats (9000 rpm, 20 min., 4 °C) wurde der wässrige Überstand dreimal mit 20 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und an einer Vigreux-Kolonne (40 °C) bis zu einem Volumen von 0,1 ml reduziert. Die Identifizierung der gebildeten Produkte erfolgte mittels GC-MS.

## **5 Analytik von Methanol bei der Keimung**

### **5.1 Bestimmung von Methanol mittels Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS)**

Die mit *Methylobacterium extorquens* ME4 ( $10^6$  CFU/ml) inokulierten Tabaksamen (75 - 100 Stücke) wurden gemäß C-4.2 in Wägegläsern mit Deckeln zur Keimung gebracht. Jeder Wägeglasdeckel wurde mit zwei Gewindeanschlüssen versehen, die mit einem Septum verschlossen wurden. Nach sieben Tagen sind die Wägegläser mit gekeimten Tabaksamen direkt an ein PTR-Massenspektrometer angeschlossen worden. Hierzu wurde mit einer Nadel das Septum durchstoßen und der Kopfraum des Wägeglases über einen PTFE-Schlauch mit dem Einlassventil des PTR-MS verbunden. Somit konnte das bei der Keimung freigesetzte Gasgemisch direkt in den Analysenraum des Gerätes gezogen und analysiert werden. Der Druckausgleich wurde mit einer Nadel im gegenüberliegenden Septum erreicht. Auch bei längerer Messzeit (20 Minuten) wurden konstante Konzentrationen im Kopfraum gemessen.

### **5.2 Nachweis von Methanol bei der Keimung mit Hilfe des Hefestammes *Pichia pastoris* als Biosensor**

#### **5.2.1 Wachstumsbedingungen und Induktion des Proteins**

*Pichia pastoris* Stämme pPKHS und pPCHIS/GFP (Boettner *et al.*, 2002) von frisch angewachsenen Platten wurden mit Hilfe einer Impföse in 10 ml YPD Medium eingebracht und für 48 Stunden inkubiert (180 rpm, 30 °C).

Um die Proteinexpression zu induzieren, wurden die durch Zentrifugation (4000 rpm, 20 min, 4 °C) erhaltenen Pellets vom YPD Medium in 10 ml YP (YPD ohne Glukose) suspendiert und mit 1,0 %igem Methanol als Kohlenstoffquelle weiter inkubiert (180 rpm, 30 °C). Die Proteinexpression wurde anschließend mit Hilfe des im C-2.6.3 beschriebenen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg) am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München kontrolliert.

### **5.2.2 Keimungsexperimente von Tabaksamen mit *Pichia pastoris* Zellen und mikroskopische Untersuchung der Blätter**

Die Zellen der im C-5.2.1 eingesetzten Hefestämme wurden nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zentrifugation (4000 rpm, 20 min, 4 °C) geerntet. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Zellen in YP Medium (YPD ohne Glukose) suspendiert. Die Suspensionen wurden für die anschließenden Keimungsexperimente eingesetzt. Hierfür wurden oberflächensterilisierte Tabaksamen verwendet, mit den Hefezellensuspensionen inokuliert und gemäß C-4.2 weiter behandelt. Nach der Samenkeimung wurden die Blätter hinsichtlich der GFP Fluoreszenz in *Pichia pastoris* Zellen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht.

## D ZUSAMMENFASSUNG

Blatt- und Fruchtoberflächen von unter natürlichen Bedingungen wachsenden Pflanzen sind immer von einer mikrobiellen Flora besiedelt. Diese Oberflächen stellen für Mikroorganismen ein attraktives Mikrohabitat dar. Im Zuge einer gemeinsamen Co-Evolution entstehen ausgeprägte biochemische und molekulare Wechselbeziehungen, die Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen waren. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag dabei auf dem Nutzen der nicht-pathogenen Mikroorganismen für die Wirtspflanzen. Hierbei wurden zunächst epiphyll Mikroorganismen aus ihren Habitaten isoliert und identifiziert. Anhand biochemischer Eigenschaften und der 16S rDNA-Analyse konnten elf epiphyll Bakterienstämme charakterisiert werden, wobei die meisten Bakterien der Gattung *Pseudomonas* angehörten. Diese isolierten Bakterien wurden in anschließenden Versuchen zur Interaktion von epiphyllen Bakterien mit Blattoberflächen eingesetzt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen an Erdbeerblättern mit besonderem Augenmerk auf die Blattmorphologie und den flüchtigen Inhaltsstoffen durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass nur Drüsenhaare mit einzelligen Köpfchen sog. „capitate glands“ neben langen Trichomen auf den Oberflächen der Erdbeerblättern vorkommen. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass epiphyll Mikroorganismen bevorzugt auf den Drüsenhaaren anzutreffen sind. Mengenmäßig gehören R,S-Linalool, Nonanal, (Z)-3-Hexenol, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol zu den wichtigsten flüchtigen Verbindungen der Erdbeerblattoberflächen, wobei R,S-Linalool und Nonanal in den Drüsenhaaren enthalten sind.

Obwohl die isolierten epiphyllen Bakterien die Erdbeerblattkomponenten R,S-Linalool, Nonanal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten konnten, waren sie jedoch in der Lage einige dieser Komponenten zu metabolisieren. Mit Ausnahme von R,S-Linalool wurden die entsprechenden Säuren als Hauptmetabolite gebildet. Bei der Biotransformation von Nonanal und weiteren aliphatischen Aldehyden (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>) durch den



Bakterienstamm *Bacillus megaterium* konnte zum ersten Mal die mikrobielle Bildung von Aldolkondensationsprodukten nachgewiesen werden.

Versuche mit dem pflanzenpathogenen Pilz *Botrytis cinerea*, der von Erdbeerblattoberflächen isoliert wurde, zeigten, dass die epiphyllen Bakterien und der Pilz um die Nährstoffe auf der Blattoberfläche konkurrieren, wobei die Epiphyllen aufgrund ihres schnellen Wachstums die Vermehrung des Pilzes unterdrücken. Zudem konnte durch Inhibierungsexperimente die Sensibilität der Bakterien und des Pilzes gegenüber den flüchtigen Komponenten der Blätter demonstriert werden. Bei den Versuchen mit R,S-Linalool, Nonanal, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol zeigte sich, dass das Wachstum von *Botrytis cinerea* bereits bei Konzentrationen gehemmt wurde, die um eine Zehnerpotenz niedriger lagen, als die Gehalte bei denen die Epiphyllen geschädigt wurden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass der Nahrungsentzug durch epiphylle Bakterien und die Wirkung von flüchtigen Komponenten einen additiven Inhibierungseffekt auf das Wachstum des Pilzes *Botrytis cinerea* ausübten. Co-Kultivierungsexperimente, bei denen epiphylle Bakterien zusammen mit *Botrytis cinerea* auf einer Malzextrakt-Agar-Platte in Gegenwart verschiedener flüchtiger Pflanzenmetabolite inkubiert wurden, bestätigten diese Hypothese. Die Untersuchungen lieferten somit wichtige Hinweise zur Funktion epiphyller Bakterien und zeigten erstmals die modulierende Wirkung flüchtiger Blatthaltstoffe auf den Antagonismus zwischen epiphyllen Bakterien und *Botrytis cinerea*. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Wirkung von *Methylobacterium extorquens*, epiphylle Bakterien die Methanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können, auf die Keimung verschiedener Samenarten durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung von *Methylobacterium extorquens* auf das Wachstum von Keimpflanzen zeigten, dass diese Bakterien offensichtlich das Wachstum bestimmter Pflanzen beeinflussen konnten. Eine signifikante Erhöhung der Biomasse bei Tabak-, Senf-, Tomaten-, Möhren- und Erdbeerkeimlingen wurde festgestellt. Vorläufige Fraktionierungsversuche deuten auf die Produktion einer wachstumsfördernden Substanz durch das Bakterium *Methylobacterium extorquens* hin.

Für die Bestimmung von Methanol aus keimenden Pflanzen erlaubte die Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) Technik eine nachweisstarke Bestimmung von Methanol in der Gasphase. Hiermit konnten gasförmige Methanolkonzentrationen reproduzierbar und zuverlässig im ppbv-Bereich gemessen werden. In der Gasphase von Tabakkeimlingen, die mit *Methylobacterium extorquens* infiziert waren, wurden signifikant geringere Methanolkonzentrationen nachgewiesen als bei mikroorganismenfreien Tabakpflanzen. Diese Beobachtung ließ den Schluß zu, dass *Methylobacterium extorquens* gasförmiges Methanol zu seinem Wachstum nutzen kann. Zusätzlich wurde mit Hilfe von *Pichia pastoris* Zellen, die Konstrukte enthielten, welche GFP unter der Kontrolle eines methanolsensitiven Promotors exprimierten, erstmals die Spaltöffnungen als Emissionsorte des Methanols identifiziert.

In dieser Arbeit konnten somit wichtige neue Erkenntnisse zur Interaktion epiphyller Mikroorganismen mit pflanzlichen Geweben erzielt werden.

## E SUMMARY

Leaf and fruit surfaces of plants grown under natural conditions are always colonized with a microbial flora. These surfaces represent attractive microhabitats for microorganisms. In the course of a common co-evolution, distinct biochemical and molecular interactions have arisen, which are the object of the conducted studies. The main focus of this work was to determine the interaction between the non-pathogenic microorganisms and the host plants. To this end, epiphyllic microorganisms were first isolated from their habitats and identified. On the basis of biochemical properties and the 16S rDNA-analysis eleven epiphyllic bacteria were characterized, nearly all of which belong to the genus *Pseudomonas*. These isolated bacteria were used in subsequent experiments of the interactions of epiphyllic bacteria with leaf surfaces.

In the first step of the work experiments on strawberry leaves were carried out paying particular attention to the leaf morphology and the plant volatile compounds. Scanning electron microscopic investigations demonstrated that only capitate glandular trichomes with a one- or two-celled head occur along with long trichomes on the strawberry leaf surfaces. Microorganisms were shown by light microscopy to be concentrated preferentially on the glandular trichomes. R,S-linalool, nonanal, (Z)-3-hexenol, benzyl alcohol, and 2-phenylethanol are the major native volatiles released by strawberry leaf surfaces, whereas R,S-linalool and nonanal are contained in capitate glands.

Although the isolated epiphyllic bacteria could not use R,S-linalool, nonanal, benzyl alcohol, and 2-phenylethanol as sole carbon sources, some isolates were able to metabolize a variety of the plant products. Except for R,S-linalool, the corresponding acids were found as major metabolites from the biotransformation experiments. During the biotransformation of nonanal and a series of aliphatic aldehydes (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>) by the bacterial strain *Bacillus megaterium*, the aldol condensation products were detected for the first time as biotransformation products.

Experiments with the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*, which was isolated from strawberry leaf surfaces, showed that the epiphyllic bacteria and the fungus compete for nutrients on the leaf surfaces, whereas the epiphyllic bacteria due to their rapid growth inhibit the propagation of the fungus. In addition inhibition experiments demonstrated the sensibility of non-pathogenic bacteria and a pathogenic fungus in the presence of volatile compounds of plant leaves. Investigations with R,S-linalool, nonanal, benzyl alcohol, and 2-phenylethanol have shown that the volatiles have a stronger inhibitory effect on *Botrytis cinerea* strain than on the epiphyllic bacteria. These results suggested that the depletion of nutrients by the epiphyllic bacteria and the impact of the plant volatiles on the pathogenic fungus resulted in an additive inhibitory effect on the proliferation of the fungus *Botrytis cinerea*. Dual culture experiments which were conducted *in vitro* on malt extract agar plates to evaluate the potential combined biological effect of epiphytic bacteria and plant volatiles on the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* confirmed this assumption. Thus, the investigations provided important clues for the function of epiphyllic bacteria and showed for the first time the modulate effect of volatile compounds of leaves on the antagonism between epiphyllic bacteria and *Botrytis cinerea*. In addition, studies were undertaken to investigate the effect of the methylotrophic bacteria *Methylobacterium extorquens*, which are capable of growth on methanol as a source of carbon and energy, on the germination of different seed species. The results of the investigations showed that epiphyllic bacteria of the genus *Methylobacterium extorquens* significantly affect the growth of certain plants. A significant increase of the biomasses of tobacco, mustard, tomato, carrot and strawberry seedlings was found Preliminary tests indicate that *Methylobacterium extorquens* produce a substance that stimulates the growth of plants.

Measurements of methanol released from germinated plants in the atmosphere were carried out using the proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) technique. With this technique, the measured concentrations of gaseous methanol were reproduceable at ppbv ranges. In the gas phase of tobacco seedlings, which were contaminated with *Methylobacterium extorquens* ME4, methanol concentrations were significantly lower than those released from microorganism-free tobacco plants. This observation shows that *Methylobacterium extorquens* can use gaseous methanol as a source of carbon and energy. Additionally, stomata were identified for

the first time as the locations of emission of methanol, using cells of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* containing a methanol sensitive promoter and the reporter gene GFP. The gene is expressed under the control of the promoter, which is tightly regulated and induced by methanol.

In this work, new insights in the interaction between epiphytic microorganisms and plant tissues have been achieved.

**F ANHANG**

**1 Partielle 16S rRNA Sequenzen der Methyltrophen**

**1.1 Partielle 16S rRNA Sequenz von *Methylobacterium extorquens* ME1 (516 bp)**

```

1      TGCAAGTCGAGCGGGCATCTTCGGATGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAAC
51     ACGTGGGAACGTACCCTTCGGTTCGGAATAACGCTGGGAAACTAGCGCTA
101    ATACCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGATCGGCCCG
151    CGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAG
201    TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA
251    GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCT
301    GATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCT
351    TTTGTCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAAGAATAAGCCCCGGCTAACT
401    TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATC
451    ACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGGCCATTCAAGTCGGGGGGTGAAGCC
501    TGTGGCTCAACCACAGGAAT
    
```

**1.2 Partielle 16S rRNA Sequenz von *Methylobacterium extorquens* ME2 (518 bp)**

```

1      AAGTCGAGCGGGCATCTTCGGATGTCAGCGGCAGACGGGTGAGTAACACG
51     TGGGAACGTACCCTTCGGTTCGGAATAACGCTGGGAAACTAGCGCTAATA
101    CCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGATCGGCCCGCGT
151    CTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAG
201    CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
251    TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGNA
301    TCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTT
351    TGTCCGGGACGATAATGACGGTACCGGAAGATTAATGTCCCGGCTAACTT
401    CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCA
451    CTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGGCGGCCATTCAAGTCGGGGGTGAAAGCCT
501    GTGGCTCAACCACAGGA
    
```

**1.3 Partielle 16S rRNA Sequenz von *Methylobacterium extorquens* ME3 (578 bp)**

```

1      CGGGCACTTCGGGTGTCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGT
51     ACCCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAAACTTGAGCTAATACCGGATACG
101    CCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGC
151    TTGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGA
201    GAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
251    AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATG
301    CCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTCCGNGAC
351    GATAATGACGGTACCGTAAGAATAAGCCCCNNCTAACTTCGTGCCAGCAG
401    CCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGTAAA
451    GGGCGCGTAGGGCGCCGATTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGGCTCAACC
501    ACAGAATTGCCTTCGATACTGGTTGGCTTGAGACCGGAAGAGGACAGCGG
551    AACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTA
    
```

**1.4 Partielle 16S rRNA Sequenz von *Methylobacterium extorquens* ME4 (424 bp)**

```
1      GGGCACTTTGGGTGTCAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTA
51     CCCTTCGGTTCGGAATAACTYAGGGAAACTTGAGCTAATACCGGATACGC
101    CCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGATCGGCCCGCGTCTGATTAGCT
151    TTTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAG
201    AGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
251    GGCAGCAGTGGGGAATATTTGACAATGGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGC
301    CGCGTGAGTGATGAAGNCCTTAGGNTTNTAAAGCTCTTTTNTCCCCGACG
351    ATAATGACGNTACCTAATAATAAGCCCCTTCTAACTTCGTGCCAGCAGCC
401    GCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCG
```

## **2 Posterbeiträge und Vorträge**

### **2.1 Posterbeiträge**

**Abanda-Nkp watt, D.; Krimm, U.; Schreiber, L.; Schwab, W.**

Flüchtige Pflanzenmetabolite verstärken die antagonistische Wirkung epiphyller Bakterien gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Botrytis cinerea*.

Regionaltagung Bayern + Süd-West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Universität Würzburg, **08.-09.03.2004**

**Abanda-Nkp watt, D.; Krimm, U.; Schreiber L.; Schwab, W.**

Interaktion von *Methylobacterium* sp. mit pflanzlichen Geweben

Sonderforschungsbereich 567, Universität Würzburg, **18.03.2003**

**Krimm, U.; Abanda-Nkp watt; D., Schwab, W.; Schreiber, L.**

Interactions between epiphytic bacteria and leaf surfaces of strawberry (*Fragaria ananassa*)

Sonderforschungsbereich 567, First Symposium, Retzbach, **4.– 6.12.2002.**

### **2.2 Vortrag**

**Abanda-Nkp watt, D.; Schwab, W.**

Interaction between epiphyllic microorganisms and plant tissues

Sonderforschungsbereich 567, First Symposium, Retzbach, **4.– 6.12.2002**



### 3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\delta$	chemische Verschiebung
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
AO	Alkoholoxidase
B. c.	<i>Botrytis cinerea</i>
BOS	Blattoberseite
BUS	Blattunterseite
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CFU	Koloniebildende Einheit (Colony Forming Unit)
cm	Zentimeter
$\text{cm}^3$	Kubikzentimeter
d	Dublett
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DDDP	3,5-Diacetyl-1,4-dihydro-2,6-dimethylpyridin
$d_f$	Filmdicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EI	Elektronenstoßionisierung
FID	Flammenionisationsdetektor
Fluoral-P	4-Amino-3-penten-2-on
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hPa	Hektopascal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HRGC	Kapillargaschromatographie (High Resolution Gas Chromatography)
Hz	Hertz

I3	Isolat 3
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KOH	Kalilauge
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Massen-Ladungsverhältnis
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
MEA	Maltextrakt-Agar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mPa	Millipascal
MS	Massenspektrometrie
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaH	Natriumhydrid
NaOCl	Natriumhypochlorit
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
p	Druck
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PME	Pektinmethylesterase
ppb	Anteile pro Milliarde (parts per billion)
ppbv	Anteile pro Milliarde per Volumen (parts per billion by volume)
PPFM	Pink Pigmented Facultative Methylo-trophs
ppm	Anteile pro Million (parts per million)
PTR	Protonen-Transfer-Reaktion

q	Quartett
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
s	Singulett
sccm	standard cubic centimeters per minute
sec.	Sekunde
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
sog.	so genannte
t	Triplett
Tab.	Tabelle
tg	Teragramm (1tg = 10 <sup>12</sup> g)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
u	Atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
var	Varietät, Sorte
v/v	Volumen/Volumen
VOC	Volatile Organic Compound
z.B.	zum Beispiel

## G LITERATURVERZEICHNIS

**Adam, W., Lukacs, Z., Harmsen, D., Saha-Möller, C.R., and Schreier, P.** (2000). Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons with the topsoil-microorganism *Bacillus megaterium*. *J.Org.Chem.* **65**:878-882.

**Ahmed, F., Al-Mutairi, E.H., Avery, K.L., Cullis, P.M., Primrose, W.U., Roberts, G.C.K., and Willis, C.L.** (1999). An unusual matrix of stereocomplementarity in the hydroxylation of monohydroxy fatty acids catalysed by cytochrome P450 from *Bacillus megaterium* with potential application in biotransformation. *Chem. Commun.* **1999**:2049-2050.

**Ammendola, A.** (1999). Einsatz der Reportergene *luxAB* und *gfp* zur Konstruktion von bakteriellen Biosensoren. Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München.

**Andersson, B.A., Holman, R.T., Lundgren, L., and Stenhagen, G.** (1980). Capillary gas chromatograms of leaf volatiles. A possible aid to breeders for pest and disease resistance. *J. Agric. Food Chem.* **28**:985-989.

**Andrews, J.H.** (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**:603-635.

**Andrews, J.H., and Harris, R.F.** (2000) The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**:145-180.

**Anthony, C.** (1982). The Biochemistry of Methyloproteobacteria. Academic Press, London: 289-316.

**Arnone, A., De Gregorio, C., Nasini, G., and Vajna De Pava, O.** (1997). Secondary mould metabolites: Part 53. Transformation of the protoilludane sesquiterpene tsugicolone. A into sterpurane derivative and its microbiological reduction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*:1523-1525.

**Atta-Ally, M.A., Brecht, J.K., and Huber, D.J.** (2000). Ethylene feedback mechanisms in tomato and strawberry fruit tissues in relation to fruit ripening and climacteric patterns. *Postharvest Biology and Technology* **20**:151-162.

**Bagchi, G.D.** (2000). Essential oil producing glands in some important aromatic plants: structure and process of secretion. *J. Med. Aromat. Plant Sci.* **22**:605-615.

**Baker, J.T., Blake, J.D., MacLeod, J.K., Ironside, D.A., and Johnson, I.C.** (1972). Volatile constituents of the scent gland reservoir of the fruit-spotting bug, *Amblypelta nitida*. *Aust. J. Chem.* **25**:393-400.

**Barsig, M., and Malz, R.** (2000). Fine structures, carbohydrates and photo-synthetic pigments of sugar maize leaves under UV-B radiation. *Environ. Exper. Botany* **43**:121-130.

**Bary de, A.** (1866). Morphology and Physiology of the fungi, lichens and myxomycetes. In: Ecology of leaf surface microorganisms (Ed. Preece, T.F and C.H. Dickenson 1971), 445.

**Beattie, G.A. and Lindow, S.E.** (1995). The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**:145-172.

**Beaulieu, J.C. and Grimm, C.C.** (2001). Identification of volatile compounds in Cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **49**:1345-1352.

**Beck, H.C., Hansen, A.M., and Lauritsen, F.R.** (2002). Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technol.* **31**:94-101.

**Bengtsson, M., Bäckman, A.-C., Liblikas, I., Ramirez, M.I., Borg-Karlson, A.-K., Ansebo, L., Anderson, P., Löfqvist, J., and Witzgall, P.** (2001). Plant odor analysis of apple: Antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. *J. Agric. Food Chem.* **49**:3736-3741.

**Bernreuther, A. and Schreier, P.** (1991). Multidimensional gas chromatography/mass spectrometry: A powerful tool for the direct chiral evaluation of aroma compounds in plant tissues. II. R,S-linalool in essential oils and fruits. *Phytochem.Anal.* **2**:167-170.

- Berto, P., Jijakli, M.H., and Lepoivre, P.** (2001). Possible role of colonization and cell wall-degrading enzymes in the differential ability of three *Ulocladium atrum* strains to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Phytopathol.* **91**:1030-1036.
- Biasioli, F., Gasperi, F., Aprea, E., Mott, D., Boscaini, E., Mayr, D., and Mark, T.D.** (2003). Coupling proton transfer reaction-mass spectrometry with linear discriminant analysis: A case study. *J. Agric. Food Chem.* **51**:7227-7233.
- Bisignano, G., Lagana, M.G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., Mazzanti, G., and Saija, A.** (2001). In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**:9-13.
- Blakeman, J.P. and Brodie, I.D.S.** (1977). Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiol. Plant Pathol.* **10**:29-42.
- Blakeman, J.P.** (1993). Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathol.* **42**:479-493.
- Bock, G., Benda, I., and Schreier, P.** (1986). Biotransformation of R,S-linalool by *Botrytis cinerea*. *J. Food Sci.* **51**:659-662.
- Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U., and Lang, C.** (2002). High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **99**:51-62.
- Bosabalidis, A.M. and Skoula, M.** (1998). A Comparative study of the glandular trichomes on the upper and lower leaf surfaces of *Origanum x intercedens* Rech. *J. Essential Oil Res.* **10**:277-286.
- Boschetti, A., Biasioli, F., van Opbergen, M., Warneke, C., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Karl, T., Hansel, A., Lindinger, W., and Iannotta, S.** (1999). PTR-MS real time monitoring of the emission of volatile organic compounds during postharvest aging of berryfruit. *Postharvest Biol. Technol.* **17**:143-151.

- Bourque, D., Pomerleau, Y., and Groleau, D.** (1995). High-cell-density production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:367-376.
- Bradshaw, J.W.S., Baker, R., and Howse, P.E.** (1975). Multicomponent alarm of the weaver ant. *Nature (London, United Kingdom)*. **258**:230-231.
- Bradshaw, J.W.S., Baker, R., and Howse, P.E.** (1979). Multicomponent alarm pheromones in the mandibular glands of major workers of the African ant, *Oecophylla longinoda*. *Physiol. Entomol.* **4**:15-25.
- Brodie, I.D.S. and Blakeman, J.P.** (1976). Competition for exogenous substrates *in vitro* by leaf surface microorganisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Plant Pathol.* **9**:227-239.
- Buckingham, J.** (1992). Dictionary of Natural Products on CD-ROM (1st Ed.), Chapman & Hall.
- Burlage, R.S. and Kuo, C.T.** (1994). Living biosensors for the management and manipulation of microbial consortia. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**:291-309.
- Buttery, R.G., Ling, L.C., and Light, D.M.** (1987). Tomato leaf volatile aroma components. *J. Agric. Food Chem.* **35**:1039-1042.
- Campeol, E., Flamini, G., Cioni, P.L., and Morelli, I.** (2003). Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. *J. Agric. Food Chem.* **51**:1994-1999.
- Carter, C.D., Sacalis, J.N., and Gianfagna, T.J.** (1989). Zingiberene and resistance to Colorado potato beetle in *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. *J. Agric. Food Chem.* **37**:206-210.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M.** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:45-66.

- Cheetham, P.S.J.** (1997) Combining a technical push and the business pull for natural flavours. In: Biotechnology of aroma compounds; Berger, R.G., (Hrsg.); Band 55: Advances in biochemical engineering biotechnology, Scheper, T., (Hrsg.) Springer; Berlin, 1-50
- Claeson, A.-S., Levin, J.-O., Blomquist, G., and Sunesson, A.-L.** (2002). Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *J. Environ. Monitoring* **4**:667-672.
- Clark, L.J., Hamilton, J.G.C., Chapman, J.V., Rhodes, M.J.C., and Hallahan, D.L.** (1997). Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of the catmint *Nepeta racemosa*. *The Plant Journal* **11**:1387-1393.
- Corre, J., Lucchini, J.J., Mercier, G.M., and Cremieux, A.** (1990). Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. *Res. Microbiol.* **141**:483-497.
- Cossins, E.A.** (1987). The biochemistry of plants. Vol II. Academic Press, San Diego, CA.
- Croft, K.P.C., Juttner, F., and Slusarenko, A.J.** (1993). Volatile products of the lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Physiol.* **101**:13-24.
- Darvill, A.G., McNeil, M., and Albersheim, P.** (1978). Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* **62**:418-422.
- Das, M., Kang, D., Aneja, V.P., Lonneman, W., Cook, D.R., and Wesely, M.L.** (2003). Measurements of hydrocarbon air-surface exchange rates over maize. *Atmospheric Environment* **37**:2269-2277.
- Davis, S.C., Sui, Z., Peterson, J.A., and Ortiz de Montellano, P.R.** (1996). Oxidation of omega-oxo fatty acids by cytochrome P450BM-3 (CYP102). *Arch. Biochem. Biophys.* **328**:35-42.
- Demetzos, C., Perdetzoglou, D., and Tan, K.** (2001). Chemical analysis and antimicrobial activity of *Halimium voldii*. *Zeitschrift für Naturforschung, C: J. Biosci.* **56**:979-982.



- Demyttenaere, J.C.R. and Willemsen, H.M.** (1998). Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*. *Phytochem.* **47**:1029-1036.
- Demyttenaere, J., Del Carmen Herrera, M., and De Kimpe, N.** (2000). Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochem.* **55**:363-373.
- Demyttenaere, J. and De Kimpe, N.** (2001) Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **11**:265-270.
- Derridj, S., Boutin, J.-P., Fiala, V., and Soldaat, L.L.** (1996). Composition en métabolites primaires de la surface foliaire du poireau: Etude comparative, incidence sur la sélection de la plante-hôte pour pondre par un insecte. *Acta bot. Gallica* **143**:125-130.
- Dianese, A.C., Ji, P., and Wilson, M.** (2003). Nutritional similarity between leaf-associated nonpathogenic bacteria and the pathogen is not predictive of efficacy in biological control of bacterial spot of tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3484-3491.
- Dickens, J.C.** (2000). Sexual maturation and temporal variation of neutral responses in adult colorado potato beetles to volatiles emitted by potato plants. *J. Chem. Ecol.* **26**:1265-1279.
- Dickinson, C.H.** (1980). Biology of *Alternaria*, *Cladosporium caldosporioides* and *C. herbarum* in respect of their activity on green plants. In: *Microbial ecology of the phylloplane* (Ed. Blakeman, J.P.):169-184).
- Doronina, N.V., Sokolov, A.P., and Trotsenko, Y.A.** (1996). Isolation and initial characterization of aerobic chloromethane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**:179-183.
- Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., Krausova, V.I., Boulygina, E.S., and Tourova, T.P.** (1998). *Methylophila capsulata* gen. nov., sp. nov., a novel non-pigmented aerobic facultatively methylotrophic bacterium. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1313-1321.

**Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., and Leisinger, T.** (2000). *Methylopila helvetica* sp nov and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp nov - Novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:210-218.

**Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., and Tourova, T.P.** (2000). *Methylarcula marina* gen. nov., sp nov and *Methylarcula terricola* sp nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylotrophic bacteria from coastal saline environments. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1849-1859.

**Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., and Leisinger, T.** (2001). *Albibacter methylovorans* gen. nov., sp nov., a novel aerobic, facultatively autotrophic and methylotrophic bacterium that utilizes dichloromethane. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1051-1058.

**Doronina, N.V., Darmaeva, T.D., and Trotsenko, Y.A.** (2001). Novel aerobic methylotrophic isolates from the soda lakes of the southern Transbaikal region. *Microbiol.* **70**:342-348.

**Doronina, N.V., Ivanova, E.G., and Trotsenko, Y.A.** (2002). New evidence for the ability of methylobacteria and methanotrophs to synthesize auxins. *Microbiol.* **71**:116-118.

**Doronina, N., Darmaeva, T., and Trotsenko, Y.** (2003). *Methylophaga natronica* sp nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from Soda Lake of the Southern Transbaikal Region. *System. Appl. Microbiol.* **26**:382-389.

**Dörnenburg, H. and Knorr, D.** (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **17**:674-684.

**Dudai, N., Larkov, O., Putievsky, E., Lerner, H.R., Ravid, U., Lewinsohn, E., and Mayer, A.M.** (2000). Biotransformation of constituents of essential oils by germinating wheat seed. *Phytochem.* **55**:375-382.

**Duetz, W.A., Bouwmeester, H., and van Beilen, J.B.** (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:269-277.

- Ebrahim, H.A. and Jamshidi, E.** (2004). Synthesis gas production by zinc oxide reaction with methane: elimination of greenhouse gas emission from a metallurgical plant. *Energy Conversion and Management* **45**:345-363; 2.
- Elad, Y.** (1992). The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotorum*) in various crop. *Plant Pathol.* **41**:417-426.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., and Gingeras, T.R.** (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:1111-1121.
- Engel, R., Gülz, P-G., Herrmann, T., and Nahrstedt, A.** (1993). Glandular trichomes and the volatiles obtained by steam distillation of *Quercus robur* Leaves. *Z. Naturforsch.* **48**:736-744.
- Fabian, P.** (1992). *Atmosphäre und Umwelt*. Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage.
- Farine, J.-P., Semon, E., Everaerst, C., Abed, D., Grandcolas, P., and Brossut, R.** (2002). Defensive selection of *Therea petiveriana*: Chemical identification and evidence of an alarm function. *J. Chem. Ecol.* **28**:1629-1640.
- Faver, K.L. and Gerik, T.J.** (1996). Foliar-applied methanol effects on cotton (*Gossypium hirsutum* L) gas exchange and growth. *Field Crops Res.* **47**:227-234.
- Fehsenfeld, F., Calvert J., Goldan, P., Guenther, A.B., Hewitt, C.N., Lamb, B., Shaw, L., Trainer, M., Westberg, H., and Zimmerman, P.** (1992). Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Global Biogeochem. Cycles.* **6**:389-430.
- Fiala, V., Glad, C., Martin, M., Jolivet, E., and Derridj, S.** (1990). Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane on maize (*Zea mays* L.): Variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytol.* **115**:609-615.
- Filonow, A.B., Vishniac, H.S., Anderson, J.A., and Janisiewicz, W.J.** (1996). Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control* **7**:212-220.

**Fisher, A.J., Grimes, H.D., and Fall, R.** (2003). The biochemical origin of pentenol emissions from wounded leaves. *Phytochem.* **62**:159-163.

**Fisher, G.S., Legendre, M.G., Lovgren, N.V., Schuller, W.H., and Wells, J.A.** (1979). Volatile constituents of southernpea seeds [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *J. Agric. Food Chem.* **27**:7-11.

**Flath, R.A., Forrey, R.R., and Guadagni, D.G.** (1973). Aroma components of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **21**:948-952.

**Fleisher, A. and Fleisher, Z.** (2000). The volatiles of the leaves and wood of Lebanon cedar (*Cedrus libani* A. Rich) aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XIV. *J. Ess. Oil Res.* **12**:763-765.

**Fokkema, N.J.** (1971). The effect of pollen in the phyllosphere of rye on colonization by saprophytic fungi and on infection by *Helminthosporium* and other leaf pathogens. *Neth. J. Pl. Path.* **77**:1-60.

**Foß, S. and Harder, J.** (1997). Microbial transformation of a tertiary allyl alcohol: Regioselective isomerisation of linalool to geraniol without nerol formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**:71-75.

**Galbally, I.E. and Kirstine, W.** (2002). The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J. Atmos. Chem.* **43**:195-229.

**Gamard, P., Sauriol, F., Benhamou, N., Bélanger, R.R., and Paulitz, T.C.** (1997). Novel butylrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *The Journal of Antibiotics* **50**:742-749

**Gang, R.G., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K.H., Simon, J.E., Lewinsohn, E., and Pichersky, E.** (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* **125**:539-555.

**Geron, C., Guenther, A., Greenberg, J., Loescher, H.W., Clark, D., and Baker, B.** (2002). Biogenic volatile organic compound emissions from a lowland tropical wet forest in Costa Rica. *Atmos. Environ.* **36**:3793-3802.

**Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J.I.M., Mihaliak, C., Karp, F., and Croteau, R.** (1992). Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal. Biochem.* **200**:130-138.

**Givan, G.V., Zhu, L., and Minto, R.E.** (2002). Dimethyl disulfide addition to 1,4-enzymes: A new route to 2,5-dialkylthiophenes. Technical Report **7**

**Goldberg, I. and Rokem, J.S.** (1991). *Biology of Methylootrophs*. Sci. Tech. Publishers, Madison, WI 53705.

**Govorukhina, N.I. and Trotsenko, Y.A.** (1990). *Methylovorus*: A new species of semifacultative methylootrophic bacteria. *Microbiol.* **59**:605-613.

**Govorukhina, N.I. and Trotsenko, Y.A.** (1991). *Methylovorus*: A new genus of restricted facultatively methylootrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:158-162.

**Guinebretiere, M.H., Nguyen-The, C., Morrison, N., Reich, M., and Nicot, P.** (2000). Isolation and characterization of antagonists for the control of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *J. Food Protection* **63**:386-394.

**Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., and Kloepper, J.W.** (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**:895-914.

**Hamilton-Kemp, T.R., McCracken, J.R., Loughrin, J.H., Andersen R.A., and Hildebrand, D.F.** (1992). Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* **18**:1083-1091.

**Hamilton-Kemp, T.R., Archbold, D.D., Loughrin, J.H., Collins, R.W., and Byers, M.E.** (1996). Metabolism of natural volatile compounds by strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **44**:2802-2805.

**Hamilton-Kemp, T.R., Archbold, D.D., Langlois, B.E., and Collins, R.W.** (1998). Antifungal activity of E-2-hexenal on strawberries and grapes. Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc. **216**:U34; 7.

**Hamilton-Kemp, T.R., Archbold, D.D., Collins, R.W., and Yang, C.-H.** (2003). Emission patterns of wound volatile compounds following injury of ripe strawberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* **83**:283-288.

**Hansel, A., Jordan, A., Holzinger, R., Prazeller, P., Vogel, W., and Lindinger, W.** (1995). Proton-transfer reaction mass-spectrometry: Online trace gas-analysis at the ppb level. *Int. J. Mass Spectrometry and Ion Proc.* **150**:609-619.

**Harder, J. and Probian, C.** (1995). Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3804-3808.

**Hashidoko, Y., Tahara, S., and Mizutani, J.** (1992). Sesquiterpene hydrocarbons in glandular trichome exudates of *Rosa rugosa* leaves. *Z. Naturforsch.* **47 c**:353-359.

**Hashidoko, Y. and Urashima, M.** (1995). Efficient preparation of browning-free glandular trichome tissues from the surfaces of leaves of *Rosa rugosa* Thunb. *Plant Cell Physiol.* **36**:127-132.

**Hashidoko, Y., Itoh, E., Yokota, K., Yoshida, T., and Tahara, S.** (2002). Characterization of five phyllosphere bacteria isolated from *Rosa rugosa* leaves, and their phenotypic and metabolic properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**:2474-2478.

**Hasunuma, T., Kuwabata, S., Fukusaki, E., and Kobayashi, A.** (2004). Real-time quantification of methanol in plants using a hybrid alcohol oxidase-peroxidase biosensor. *Anal. Chem.* **76**:1500-1506.

**Haughland, R.P.** (1996). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6th Ed.: Molecular probes: Eugene, O.R., Chap. 10.

**Hayata, Y., Sakamoto, T., Kozuka, H., Sakamoto, K., and Osajima, Y.** (2002). Analysis of aromatic volatile compounds in 'Miyaba' melon (*Cucumis melo* L.) using the porapak Q column. *J. Jap. Soc. Hort. Sc.* **71**:517-525.

**Hedlund, S.G. and Kil, B. S.** (1969). Physiological mechanism involved in hangover. I: Oxidation of some lower aliphatic fusel alcohols and aldehydes in rat liver and their effect on the mitochondrial oxidation of various substrates. *Acta Pharm. Toxicol.* **27**:381-396.

**Heiden, A.C., Kobel, K., Langebartels, C., Schuh-Thomas, G., and Wildt, J.** (2003). Emissions of oxygenated volatile organic compounds from plants. Part I: Emissions from lipoxygenase activity. *J. Atmosph. Chem.* **45**:143-172.

**Helbig, J., Trierweiler, B., Schulz, F.A., and Tauscher, B.** (1998). Inhibition of *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. and *Penicillium digitatum* Sacc. by *Bacillus* sp. (Isolate 17141) *in vitro*. *J. Plant Dis. Prot.* **105**:8-16.

**Higgins, I.J. and Lowe, C.R.** (1987). Introduction to the principles and applications of biosensors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B316**:3-11.

**Hirano, S.S. and Upper, C.D.** (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*: A pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:624-653.

**Holland, M.A. and Polacco, J.P.** (1994). PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:197-209.

**Holland, M.A.** (1997). Methylobacterium and plants. *Plant Physiol.* **1**:207-213.

**Holland, H.L. and Lakshmaiah, G.** (1999). Microbial hydroxylation of 2-Oxatestosterone. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **6**:83-88.

**Holzinger, R., Sandoval-Sato, L., Rottenberger, S., Crutzen, P.J., and Kesselmeir, J.** (2000). Emissions of volatile organic compounds from *Quercus ilex* L. measured by proton transfer reaction mass spectrometry under different environmental conditions. *J. Geophys. Res. [Atm.]* **105**:20573-20579

**Hook, I., Ryan, S., and Sheridan, H.** (1999). Biotransformation of aromatic aldehydes by five species marine microalgae. *Phytochem.* **51**:621-627.

**Hornschuh, M., Grotha, R., and Kutschera, U.** (2002.) Epiphytic bacteria associated with the bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effects of methylobacterium strains on protonema development. *Plant Biol.* **4**:682-687.

**Hylemon, P.B. and Harder, J.** (1999). Biotransformation of monoterpenes, biles acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **22**:475-488.

**Ivanova, E.G., Doronina, N.V., Shepelyakovskaya, A.O., Laman, A.G., Brovko, F.A., and Trotsenko, Y.A.** (2000). Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiol.* **69**:646-651.

**Janvier, M., Regnault, B., and Grimont, P.** (2003). Development and use of fluorescent 16S rRNA-targeted probes for the specific detection of Methylophaga species by in situ hybridization in marine sediments. *Res. Microbiol.* **154**:483-490.

**Jaques, M.-A., Kinkel, L.L., and Morris, C.E.** (1995). Population sizes, immigrations, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endiva* var. *latifolia*). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:899-906.

**Ji, P. and Wilson, M.** (2002). Assessment of the importance of similarity on carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4383-4389.

**Johansen, I-R., Line, G., Honne, A., and Mitdgaard, T.** (1997). Calibration on an FT-IR-Spektrometer for an ambient air monitoring using PLS. *Appl. Spectrosc.* **51**:1540-1546.

**Jones, P. and Vogt, T.** (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**:164-174.

**Joshi, J. and Holland, M.A.** (1999). Method for treating plants. US Patent 5,961,687.

**Kain, S.R., Adams, M., Kondepudi, A, Yang, T.T., Ward, W.W., and Kitts, P.** (1995). The green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *BioTechniques* **19**:650-655.

**Kalemba, D. and Kunicka, A.** (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**:813-829.



- Kalyaeva, M.A., Zacharchenko, N.S., Doronina, N.V., Rukavtsova, E.B., Ivanova, E.G., Alekseeva, V.V., Trotsenko, Y. A., and Bur'yanov, Y.I.** (2001). Plant growth and morphology *in vitro* is promoted by associated methylotrophic bacteria. *Rus. J. Plant Physiol.* **48**:596-599.
- Katsumi, U., Yukio, H., Kazuaki, N., Akihiro, S., and Takayuki, S.** (1992). Volatile constituents of green and ripened pineapple (*Ananas comusus* [L.] Merr). *J. Agric. Food Chem.* **40**:599-603.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., and Heinonen, M.** (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **48**:4076-4082.
- Kemp, T.R., Stoltz, L.P., Smith Jr, W.T., and Chaplin, C.E.** (1968). The composition of the essential oil of leaves of strawberry cultivar citation. *Am. Soc. Hort. Sc.* **93**:334-339.
- Kim, Y.S. and Kil, B.S.** (2001). Allelopathic effects of some volatile substances from the tomato plant. *J. Crop Prod.* **4**:313-321.
- King, A. and Dickinson, J.R.** (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **16**:499-506.
- Kinkel, L.L.** (1997) Microbial Population Dynamics on Leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:327-347.
- Kirstine, W., Galbally, Y., and Hooper, M.** (1998). Emissions of volatile organic compounds (primarily oxygenated species) from pasture. *J. Geophys. Res.* **103**:10605-10619.
- Kitahara, T., Takagi, Y., and Matsui, M.** (1980). Structure and the synthesis of novel constituents of Yudzu peel oil and their conversion to related mono-terpenes. *Agric. Biol. Chem.* **44**:897-901.
- König, G., Brunda, M., Puxbaum, H., Hewitt, C.N., Duckham, S.C., and Rudoph, J.** (1995). Relative contribution of oxygenated hydrocarbons to the total biogenic VOC emissions of selected mid-european agricultural and natural plant species. *Atmosph. Environ.* **29**:861-874.

- Korotkova, N.A., Doronina, N.V., and Trotsenko, Y.A.** (1997). Biosynthesis of 3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate copolymer by methylobacteria with the serine metabolic pathway. *Appl. Biochem. Microbiol.* **33**:353-358.
- Korpia, A., Pasanena, A., Pasanena, P., and Kalliokoskia, P.** (1997). Microbial growth and metabolism in house dust. *Int. Biodeterioration & Biodegradation* **40**:19-27.
- Kouzi, S.A., Chatterjee, P., Pezzoto, J.M., and Hamann, M.T.** (2000). Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. *J. Nat. Prod.* **63**:1653-1657.
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Poulain-Godefroy, O., and Locht, C.** (1995). Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**:913-922.
- Krimm, U.** (2001). Untersuchung zur epiphyllen Mikroflora in der Phyllosphäre von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta. Diplomarbeit am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaft der Universität Würzburg.
- Kubo, A., Lunde, C.S., and Kubo, I.** (1995). Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* **43**:1629-1633.
- Kubo, I., Fujita, K-I., Kubo, A., Nihei, K-I., and Lunde, C.S.** (2003). Modes of antifungal action of (2E)-alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **51**:3951-3957.
- Kubo, J., Lee, J.R., and Kubo, I.** (1999). Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *J. Agric. Food Chem.* **47**:533-537.
- Lahman, E., Seifert, B., and Dulson, W.** (1978). *Bundesgesundheitsblatt* **21**:75.
- Last, F.T.** (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **38**:453-464.
- Lattanzio, V., De Cicco, V., Di Venere, D., Lima, G., and Salerno, M.** (1994). Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Ital. J. Food Sc.* **6**:23-30.

**Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., and Julkunen-Tiitto, R.** (2003). Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. *Environ. Experim. Botany* **49**:49-60.

**Lee, H.-I., Jeong, K.-S., and Cha, J.S.** (2002). PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**:276-280.

**Leibrock, E. and Slemr, J.** (1997). Method for measurement of volatile oxygenated Hydrocarbons in ambient air. *Atm. Environ.* **20**:3329-3339.

**Leveau, J.H.J. and Lindow, S.E.** (2001). Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *PNAS* **98**:3446-3453.

**Lilja, A., Karjalainen, R., Parikka, P., Kammiovirta, K., and Nuorteva, H.** (1998). Pathogenicity and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from silver birch and strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**:529-535.

**Lilley, A.K., Cory, J.S., and Bailey, J.M.** (1997). The dispersal and establishment of pseudomonad populations in the phyllosphere of sugar beet by phytophagous caterpillars. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**:151-157.

**Lin, Y. and Wagner, G.J.** (1994). Rapid and simple method for estimation of sugar esters. *J. Agric. Food Chem.* **42**:1709-1712.

**Lindinger, W. and Hansel, A.** (1998). Analysis of trace gases at ppb levels by proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Plasma Sources Sci. Technol.* **6**:111-117.

**Lindinger, W., Hansel, A., and Jordan, A.** (1998). Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): online monitoring of volatile organic compounds at pptv levels. *Chem. Soc. Rev.* **27**:347-354.

**Lindinger, W., Hansel, A., and Jordan, A.** (1998). Online monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS): Medical applications, food control and environmental research. *Int. J. Mass Spectrometry* **173**:191-241.

- Lindow, S.E. and Andersen, G.L.** (1996). Influence of immigration on epiphytic bacterial populations of navel orange leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2978-2987.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T.** (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1875-1883.
- Lloyd, H.A., Blum, M.S., Snelling, R.R., and Evans, S.L.** (1989). Chemistry of mandibular and Dufour's gland secretions of ants in genus *Myrmecocystus*. *J. Chem. Ecol.* **15**:2589-2599.
- Lowe, C.R.** (1984). Biosensors. *Trends in Biotechnol.* **2**:79-84.
- Lucchini, J.J., Corre, J., and Cremieux, A.** (1990). Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. *Res. Microbiol.* **141**:499-510.
- Lundgren, L., Norelius, G., and Stenhagen, G.** (1985). Leaf volatiles from some wild tomato species. *Nordic J. Bot.* **5**:315-320.
- Lüttge, U., Kluge, M., and Bauer, G.** (1994). *Botanik 2. Auflage.* VCV Weinheim.
- MacDonald, R.C. and Fall, R.** (1993). Detection of substantial emissions of methanol from plants to the atmosphere. *Atm. Environ. Part A. General Topics* **27**:1709-1713.
- Manninen, S., Siivonen, N., Timonen, U., and Huttunen, S.** (2003). Differences in ozone response between two finnish wild strawberry populations. *Environ. Experimental Botany* **49**:29-39.
- Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Echard, B.W., Bagchi, D., and Preuss, H.G.** (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell Biochem.* **228**:111-117.
- Masih, E.I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Ait Barka, E., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya, A., and Paul, B.** (2001). Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biocontrol of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiol.* **202**:227-232.

- McCaskill, D. and Croteau, R.** (1995). Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* **197**:49-56.
- McGrath, R. and Singleton, I.** (2000). Pentachlorophenol transformation in soil: A toxicological assessment. *Soil Biol. Biochem.* **32**:1311-1314.
- Mercier, J. and Lindow, S.E.** (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369-374 **66**:369-374.
- Mew, T.W.** (1978). Distinction between *Xanthomonas oryzae* strains causing leaf blight and wilt symptoms of rice. Int.Rice Res.Inst., Los Banos, Philippines. Proc. Int. Conf. Plant Pathog. Bact., 4th **1**:371-374.
- Misra, G., Pavlostathis, S.G., Perdue, E.M., and Araujo, R.** (1996). Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:831-838.
- Moleyar, V. and Narasimham, P.** (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* **16**:337-342.
- Moline, H., Etta Hubbard, J., Karns, J.S., Buyer, S., and Cohen, J.D.** (1999). Selective isolation of bacterial antagonists of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**:95-101.
- Monier, J.-M. and Lindow, S.E.** (2004). Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:346-355.
- Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silvia, P., and Besoain, X.** (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Environ. Biotechnol.* **6**.
- Mori, T. and Sakura, M.** (1999). Preparation of conditioned medium to stimulate anthocyanin production using suspension cultures of *Fragaria ananassa* cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**:635-673.
- Morris, C.E., Monier, J.-M., and Jaques, M.-A.** (1998). A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4789-4795.

**Morris, R.O., Bilyeu, K.D., Laskey, J.G., and Cheikh, N.N.** (1999). Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **255**:328-333.

**Mosandl, A.** (1995). Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils. *Food Rev. Int.* **11**:597-664

**Moshonas, M.G. and Lund, E.D.** (1969). Isolation and identification of a series of alpha, beta-unsaturated aldehydes from valencia orange peel oil. *J. Agric. Food Chem.* **17**:802-804.

**Nandi, A.S. and Sen, S.P.** (1981). Utility of some nitrogen-fixing microorganisms in the phyllosphere of crop plants. *Plant and Soil* **63**:465-476.

**Nari, J., Noat, G., and Ricard, J.** (1991). Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Biochem. J.* **279**:343-350.

**Neidhart, S.** (1997). Einfluss unterschiedlicher Strukturelemente von Pektinen auf das rheologische Verhalten entsprechender Gele. Dissertation am Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.

**Nemecek-Marshall, M., Macdonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., and Fall, R.** (1995). Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiol.* **108**:1359-1368.

**Newman, K.L., Almeida, R.P., Purcell, A.H., and Lindow, S.E.** (2003). Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **12**:7319-7327.

**Nonomura, A.M. and Benson, A.A.** (1992). The path of carbon in photo-synthesis. 24. improved crop yields with methanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:9794-9798.

- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Inanlou, D.N., and Farahmand, B.** (2003). Biotransformation of alcohols to aldehydes by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5080. *Enzyme and Microbial Technology* **33**:150-153.
- Noshi et al.** (1993). In Proceedings of Twentieth Annual Meeting Plant Growth Regulator Society of America, Ferguson, ed., pp 8-13.
- Nursten, H.E.** (1970). Volatile compounds: the aroma of fruits. *The Biochemistry of Fruits and their Products* **1**:240-267.
- Obendorf, R.L., Koch, J.L., Gorecki, R.J., Amable, R.A., and Aveni, M.T.** (1990). Methanol accumulation in maturing seeds. *J. Exptl. Bot.* **41**:489-495.
- Omer, Z.S., Tombolini, R., and Gerhardson, B.** (2004). Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**:319-326
- Onken, J. and Berger, R.G.** (1999). Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in an aerated-membrane bioreactor. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **51**:158-163.
- Oßwald, W.** (1995). Vorgeformte und induzierte Abwehrmechanismen von Wirtspflanzen. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Hock, B.; Elstner, E.F.(Hrsg). 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. 315-319.
- Paramonov, E.A., Khalilova, A.Z., Odinkov, V.N., and Khalilov, L.M.** (2000). Identification and biological activity of organic compounds isolated from plants and insects. III. Chromatography-Mass Spectrometry. *Chemistry of Natural Compounds* **36**:584-586.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., and Kole, C.R.** (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.* **89**:39-46.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., and Benoît A.** (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**:65-70.

**Paul, B.** (1999). *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. FEMS Microbiol. Lett. **181**:277-280.

**Pavlostathis, S.G. and Misra, G.** (1999). Biotransformation of selected monoterpenes under nitrate-reducing conditions. Appl Microbiol Biotechnol **53**:63-68.

**Peel, D. and Quayle, J.R.** (1961). Microbial growth on C1 compounds. I. Isolation and characterization of Pseudomonas AM 1. Biochem. J. **81**:465-469.

**Peters, M.W., Meinhold, P., Glieder, A., and Arnold, F.H.** (2003). Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. J. Am. Chem. Soc. **125**:13442-13450.

**Pérez, A.G., Sanz, C., Olías, R., and Olías, J.M.** (1997). Effect of ethyl jasmonate on *in vitro* strawberry ripening. J. Agric. Food Chem. **45**:3733-3737.

**Potter, T.L. and Fagerson, I.S.** (1990). Composition of coriander leaf volatiles. J. Agric. Food Chem. **38**:2054-2056.

**Pyysalo, T., Honkanen, E., and Hirvi, T.** (1979). Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated berries, *Fragaria x ananassa* cv. *Senga sengana*. J. Agric. Food Chem. **27**:19-22.

**Rajaonarivony, J.I.M., Gershenzon, J., and Croteau, R.** (1992). Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*). Arch. Biochem. Biophys. **269**:49-57.

**Rao, S.R. and Ravishankar, G.A.** (2000). Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. J. Biotechnol. **76**:137-146.

**Raven, P.H., Everst, R.F., and Eichhorn, S.E.** (2000). Die Dynamik der Lebensgemeinschaften und der Ökosysteme. In: Biologie der Pflanzen. 3. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin. 822-847.

**Rice, E.W., Reasoner, D.J., Johnson, C.H., and DeMaria, L.A.** (2000). Monitoring for methylobacteria in water systems. J. Clinical Microbiol. **38**:4296-4297.



**Roshchinam, V.V. and Roshchina, V.D.** (1993). The excretory function of higher plants. Springer Verlag, Berlin.

**Rossi, R., Carpita, A., and Messeri, T.** (1992). Selective synthesis of (S)-1-methylbutyl (E)-2,4-dimethyl-2-pentanoate, and aggregation pheromone component of *Rhyzoperta dominica*, and of (E)-2-butyl-2-octenal, an alarm pheromone component of *Oecophylla longinoda*, via 2-substituted 1-silyl-1-stannylethenes. Synthetic Commun. **22**:603-616.

**Ruinen, J.** (1961). The phyllosphere. I. An ecologically neglected milieu. Plant and Soil **15**:81.

**Schaller, A.** (2002). Die Abwehr von Fressfeinden: Selbstverteidigung im Pflanzenreich. Naturforschende Gesellschaft Zürich **147**:141-150

**Scheig, R. and Klatskin, G.** (1968). Hepatic metabolism of 2-C<sub>14</sub> octanoic and 1-C<sub>14</sub> palmitic acids. In: 40Th Fall Meeting Program of the American Oil Chemists Society: Symposium on medium chain triglycerides, 2-5 October 1966. J. Am. Oil Chem. Soc. **45**:31-33.

**Schena, L., Nigro, F., Pentimore, I., Ligorio, A., and Ippolito, A.** (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biol. Technol. **30**:209-220.

**Schonholzer, F., Hahn, D., Zarda, B., and Zeyer, J.** (2002). Automated image analysis and in situ hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. J. Microbiol. Meth. **48**:53-68.

**Schwab, B., Folkers, U., Ilgenfritz, H., and Hülskamp, M.** (2000). Trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. The Royal Society **355**:879-883.

**Schwab, W. and Roscher, R.** (1997). 4-Hydroxy-3(2)-furanones: Natural and maillard products. Recent Res. Devel. in Phytochem. **1**:643-673.

**Sengbusch, P.** (2000). Epidermis. Botanik online:1-5.

**Shimoni, E., Ravid, U., and Shoham, Y.** (2000). Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. J. Biotechnol. **78**:1-9.

**Simmonds, J. and Robinson, G.K.** (1998). Formation of benzylaldehyde by *Pseudomonas putida* ATCC 12633. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:353-358.

**Singh, H.B., Kanakidou, M., Crutzen, P.J., and Jacob, D.J.** (1995). High concentrations and photochemical fate of oxygenated hydrocarbons in the global troposphere. Nature **378**:50-54.

**Struis, R.P.W.J. and Stucki, S.** (2001). Verification of the membrane reactor concept for the methanol synthesis. Appl. Cat. A:General **216**:117-129.

**Swadling, I.R. and Jeffries, P.** (1998). Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. Biocontrol Sci. Technol. **8**:439-448.

**Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., and Dreyfus, B.** (2001). Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. **183**:214-220.

**Takacs, S., Gries, G., and Gries, R.** (2001). Communication ecology of webbing clothes moth: 2. Identification of semiochemicals mediating attraction of adults to larval habitat. J. Chem. Ecol. **27**:1547-1560.

**Takei, K., Sakakibara, H., and Sugiyama, T.** (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. **276**:26405-26410.

**Tellez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M., and Duke, S.O.** (1999). Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. Phytochem. **52**:1035-1040.

**Thompson, I.P., Bailey, J., Ellis, R.J., Lilley, A.K., McCormack, P.J., Purdy, K.J., and Rainey, P.B.** (1993). Short-term community dynamics in the phyllosphere microbiology of field-grown sugar beet. FEMS Microbiol. Ecol. **16**:205-211.

**Thomson, A.W., O'Neill, J.G., and Wilkinson, J.F.** (1976). Acetone Production by Methylobacteria. Archives of Microbiology **109**:243-246.

**Tichit, D., Lutic, D., Coq, B., Durand, B., and Teissier, R.** (2003). The aldol condensation of acetaldehyde and heptanal on hydrotalcite-type catalysts. *J. Catalysis* **219**:167-175.

**Toraya, T., Yongsmith, B., Tanaka, A., and Fukui, S.** (1975). Vitamin B12 production by a methanol-utilizing bacterium. *Appl. Microbiol.* **30**:477-479.

**Torres y Torres, J.L. and Rosazza, J.P.N.** (2001). Microbial transformation of p-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *J. Nat. Prod.* **64**:1408-1414.

**Trombetta, D., Saija, A., Bisignano, G., Arena, S., Caruso, S., Mozzanti, G., Uccella, N., and Castelli, F.** (2002). Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**:285-290.

**Trotsenko, Y.A., Ivanova, E.G., and Doronina, N.V.** (2001) Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiol.* **70**:392-397.

**Trotsenko, Y.A. and Doronina, N.V.** (2003). The biology of methylobacteria capable of degrading halomethanes. *Microbiol.* **72**:121-131.

**Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509-544.

**Utama, M.S., Wills, B.H., Ben-Yehoshua, S., and Kuek, C.** (2002). In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* **50**:6371-6377.

**Valdivieso, V.D. and Schwabe, A.D.** (1964). Effect of exclusion of hepatic circulation on oxidation of octanoic acid in the rat. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **116**:290-292.

**van Buren, J.P.** (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: *The chemistry and technology of pectin.* R.H. Walter (Hrsg.), Academic Press, San Diego: 1-22.

**Van De Water, R.W.** (2000). Direct small molecule catalyzed asymmetric aldol reactions. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **39**:1352-1374.

**van Dyk, M.S. and Thomas, E.** (1998). Hydrolysis of linalyl acetate and alpha-terpinyl acetate by yeasts. *Biotechnol. Lett.* **20**:417-420.

**Vareschi, V.** (1918). The composition of cereal grains; mistakes made in locating the chemical constituents of wheat and rice grains; aleurone *Ann. Accad. Agr. Torino* **61**:3-31.

**Walker, J.T., Rogers, J., and Keevil, C.W.** (1994). An investigation of the efficacy of a bromine-containing biocide on an aquatic consortium of planktonic and biofilm microorganisms including *Legionella-Pneumophila*. *Biofouling* **8**:47-54.

**Wang, L., Lord, H., Morehead, R., Dorman, F., and Pawliszyn, J.** (2002). Sampling and monitoring of biogenic emissions by eucalyptus leaves using membrane extraction with sorbent interface (MESI). *J. Agric. Food Chem.* **50**:6281-6286.

**Warneke, C., Karl, T., Judmaier, H, Hansel, A , Jordan, A., Lindinger, W., and Crutzen, P.** (1999). Proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS): propanol in human breath. *Global Biogeochem.* **13**:61-70.

**Whittenbury, R., Phillips, K.C., and Wilkinson, J.F.** (1970). Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**:205-218.

**Wildman, H.G. and Parkinson, D.** (1981). Seasonal changes in water-soluble carbohydrates of *Populus tremuloides* leaves. *Can. J. Bot.* **59**:862-869.

**Wilson, M. and Lindow, S.E.** (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4468-4477.

**Wood, W.F. and Weldon, P.J.** (2002). The scent of the reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *Biochem. System. Ecol.* **30**:913-917.

**Wüst, M. and Mosandl, A.** (1999). Important chiral monoterpenoid ethers in flavours and essential oils: Enantioselective analysis and biogenesis. *Eur. Food Res. Technol.* **209**:3-11.

**Yaacob, K.B.** (1987). Kesom oil: A natural source of aliphatic aldehydes. *Perfumer & Flavorist* **12**:27-30.

**Yang, C-H., Crowley, D.E., Borneman, J., and Keen, N.T.** (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:3889-3894.

**Yerger, E.H., Grazzini, R.A., Hesk, D., Cox-Foster, D.L., Craig, R., and Mumma, R.O.** (1992). A rapid method for isolating glandular trichomes. *Plant Physiol.* **99**:1-7.

**Yun-Son, H., Sheng-Wun, L., Ling, L., and Yao-Jung, C.** (1995). The mechanistic study and synthetic applications of the base treatment in the ozonolytic reactions. *Tetrahedron* **51**:5019-5034.

**Zabetakis, I.** (1997) Enhancement of flavor biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **50**:179-183.

**Zavala-Sanchez, M.A., Perez-Gutierrez, S., Perez-Gonzalez, C., Sanchez-Saldivar, D., and Arias-Garcia, L.** (2002). Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharm. Biol. (Lisse, Netherlands)* **40**:263-268.

**Zhao, Y.X. and Kang, L.** (2002). Role of plant volatiles in host plant location of the leafminer, *Liriomyza sativa* (Diptera: Agromyzidae). *Physiol. Entomol.* **27**:103-111.

**Zhu, W. and Lockwood, G.B.** (2000). Enhanced biotransformation of terpenes in plant cell suspensions using controlled release polymer. *Biotechnol. Lett.* **22**:659-662.

## **EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Freising, am 05.11.2004

Daniel Abanda-Nkpwatt