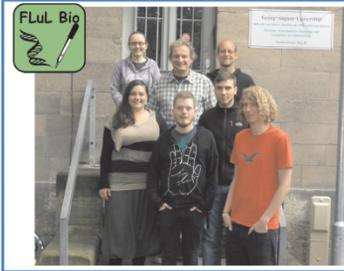


Assessment der Biodiversität terrestrischer pflanzlicher Mikroorganismen und Cynobakterien in den Tropen

Prof. Dr. Thomas Friedl, Fabian Faßhauer, Nataliya Rybalka, Patrick Probst, Maria Sasonowa, Felix Kaufholz, Alexander Weber
Biologische Fakultät, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen



Einleitung

Der tropische Bergregenwald wird als einer der bedeutendsten, aber auch einer der am meisten gefährdeten "Hotspots" der Biodiversität angesehen. In diesem Projekt haben wir uns der Aufgabe gestellt, die Biodiversität von terrestrischen Grünalgen, die auf Baumrinde, Blättern und im Boden leben, mit molekularen Signaturen ("DNA Barcodes") zu untersuchen. Das Projekt ist eng verbunden mit einem DFG-Forschungsprojekt der Abteilung EPSAG, das die Biodiversität terrestrischer Algen auf unterschiedlichen Höhenstufen im Podocarpus National Park in Ecuador untersucht. Analysen der DNA Barcodes terrestrischer Grünalgen lassen sich ohne besondere Vorkenntnisse durchführen. Die dabei erlernten Methoden sind auch in anderen Bereichen der Biodiversitätsforschung einsetzbar.

Fragestellung

- Stellt der tropische Bergregenwald auch für terrestrische Grünalgen einen *hotspot* der Biodiversität dar?
- Sind die terrestrischen Grünalgen im Podocarpus National Park verschieden von denen vergleichbarer Standorte in Mitteleuropa?
- Verändert sich die Biodiversität der terrestrischen Grünalgen entlang eines Höhengradienten?

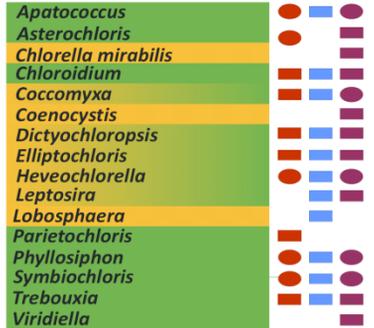
Material & Methoden

Proben epiphytischer Algenkrusten auf Baumstämmen und Blättern sowie von Böden wurden von Teambetreuer Fabian Faßhauer im Februar 2011 bei 1000m (Bombuscaro), 2000m (San Francisco Valley) und 3000m (Region Cajanuma) gesammelt (Abb. 1a - 1c). Im Projekt wurden dann aus den Proben DNA extrahiert, ein Bereich der kernkodierten ribosomalen RNA-Gene mittels PCR amplifiziert (Abb. 2), kloniert und jeder Klon im Bereich der 18S rDNA (für phylogenetische Analysen) und die ITS2 rDNA (DNA Barcode) sequenziert. Die Sequenzen wurden in einer Datenbank mit verfügbaren Sequenzen des laufenden DFG-Projektes und anderer Projekte verglichen (ARB, BioEdit) und schließlich Phylogenien mit dem bayesianischen Verfahren (MrBayes) berechnet.

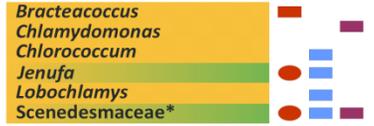
Ergebnisse & Interpretation

- 20 Phylotypen auf Gattungsniveau aus drei Klassen der Grünalgen sowie eine Gattung der Diatomeen wurden nachgewiesen (Abb. 3). Trotz der noch geringen Probenanzahl ist die Algenbiodiversität damit höher als in vergleichbaren mitteleuropäischen Lebensräumen.
- Mit der Ausnahme von zwei (*Phyllosiphon*, *Heveochlorella*) sind alle anderen Gattungen ebenfalls aus temperaten Regionen bekannt. Analysen des DNA-Barcodes zeigen aber am Beispiel der Gattung *Coccomyxa*, daß neue Linien auftreten, die nicht näher mit bisher bekannten Arten (Referenzkulturen der Sammlung von Algenkulturen an der Universität Göttingen, SAG) verwandt sind (Abb. 4). In der phylogenetischen Analyse treten Linien auf, die zeigen, daß die im Projekt bearbeiteten Algenklone (wie auch andere aus dem DFG-Projekt) nicht näher mit SAG-Referenzstämmen verwandt sind. Ob es sich dabei um neue Arten handelt, müssen weitere ITS2-DNA-Analysen zeigen (Bspl. Abb. 5)
- Es wurden Algen gefunden, die offensichtlich auf bestimmte Substrate spezialisiert sind (z.B. *Phyllosiphon* auf Blättern; *Apatococcus*, *Chloroidium* und *Trentepohliales* auf Baumrinde (Abb. 3).
- Veränderungen der Biodiversität entlang des Höhengradienten sind nicht zu erkennen (aber bisher geringe Probenanzahl).

Trebouxiophyceae



Chlorophyceae



Ulvophyceae



Bacillariophyceae



Abb. 3: Übersicht über die Alphadiversität auf Basis von phylogenetischen 18S-Analysen von ca. 1500 Klonen

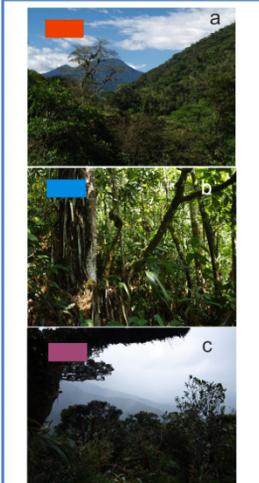


Abb. 1: Höhenstufen im Podocarpus Ntl. Park
a) Rio Bombuscaro (1000m ü.NN)
b) Rio San Francisco (2000m ü.NN)
c) Cajanuma (3000m ü.NN)

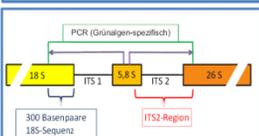


Abb. 2: Übersicht über den verwendeten molekularen Ansatz

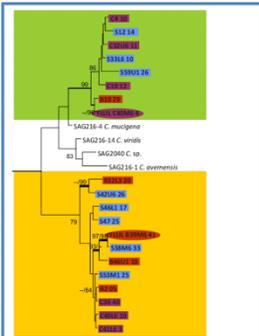


Abb. 4: Bayesianischer Stammbaum der ITS2-Sequenzen von durch 18S-Phylogenie als *Coccomyxa* identifizierten Klonen.

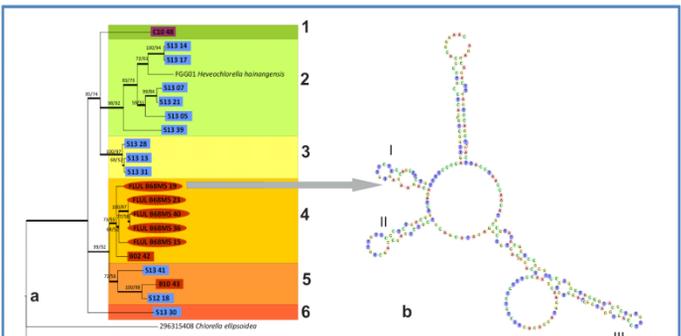


Abb. 5: a) Bayesianischer Stammbaum aus ITS2-Sequenzen aus durch 18S-Phylogenie als *Heveochlorella* identifizierten Klonen. b) Sekundärstrukturmodell der ITS2 rDNA von *Heveochlorella*-Klon FLUL B68M5 19 mit den drei charakteristischen Helices.

Forschendes Lehren und Lernen

Rekapitulation des Arbeitsablaufes mit Symbolbildern



Sammeln der Proben im Podocarpus Nationalpark, Ecuador (vor Projektbeginn)



Aufschluss der Proben und **DNA-Extraktion**



PCR (Polymerase Kettenreaktion): Amplifikation eines Abschnittes der ribosomalen DNA



Gelelektrophorese: Verifikation der PCR-Produkte durch Visualisierung der DNA



Blue-White Screening zur Erfolgskontrolle



Klonierung: Insertion des PCR-Produktes in ein *E. coli*-Vektorplasmid

Sequenzierung:

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wurden die Proben an eine Firma in den Niederlanden geschickt.

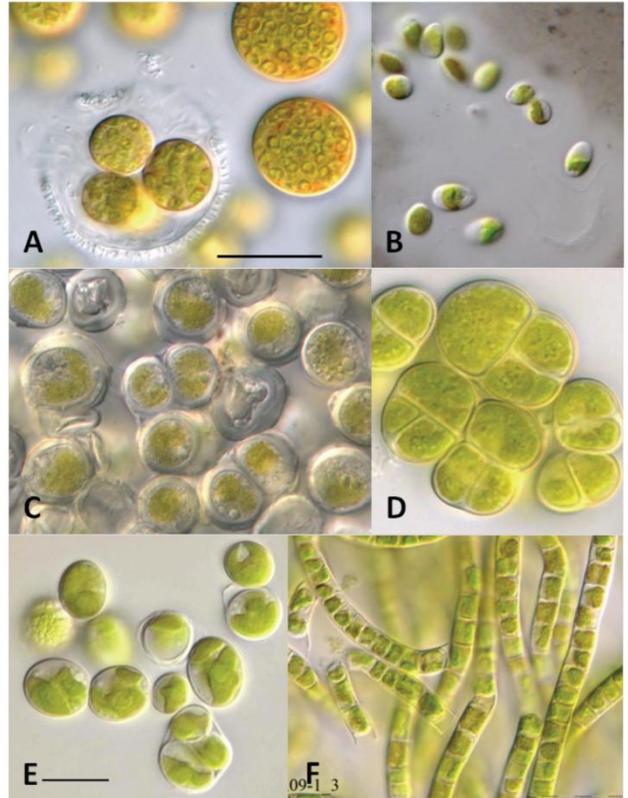


Die erhaltenen Sequenzen wurde mit **Methoden der Bioinformatik** ausgewertet. Die Ergebnisse wurden aufbereitet und werden nebenstehend präsentiert.



Die Ergebnisse wurden auf dem „**European Phycological Congress (EPC5)**“, Rhodos (Griechenland), 4. - 9. September 2011, als Poster präsentiert.

Bespiele terrestrischer Grünalgen



- A) *Bracteacoccus giganteus*, isoliert aus einer Bodenkruste der ariden Zone Südafrikas. Verbreitung durch Tochterzellen (Autosporen), die innerhalb der verschleimenden Mutterzellwand gebildet wurden.
- B) Unidentifizierte kokkale Grünalge (Radiococcaceae) aus einem Biofilm auf einer Biomülltonne. Schleimbildung um die Zellen.
- C) *Apatococcus* sp., eine Grünalge die Biofilme auf künstlichen Substraten und Aufwuchs auf Baumrinde dominiert. Dicke Zellwände, die als Schutz vor Austrocknung dienen.
- D) *Apatococcus lobatus* in Kultur mit Bildung von Zellpaketen, die Zellwände sind dünner.
- E) *Chloroidium ellipsoideum* in Kultur, von einem Biofilm auf künstlichem Substrat isoliert.
- F) *Klebsormidium* sp., eine fadenförmige Grünalge, die sich durch Fragmentation der Fäden vermehrt.