

Bakterien-Algen-Interaktionen: Die Grünalge *Ulva* (Chlorophyta) kommt nur mit den richtigen Bakterien in Form

Thomas Wichard

Zusammenfassung

Die marine Makroalge *Ulva*, auch Meersalat genannt, lebt in enger Gemeinschaft mit einer komplexen bakteriellen Begleitflora. In der Natur können sich einige *Ulva*-Arten massenhaft vermehren und Algenblüten ausbilden, wenn ungeklärte und nährstoffreiche Abwässer aus Landwirtschaft und Städten ins Meer gelangen. Ohne Bakterien entwickelt sich der Meersalat lediglich zu einem unförmigen Zellhaufen; erst nach Zugabe bestimmter Bakterien bildet *Ulva* wieder ihre normale Gestalt aus. Überraschenderweise reicht eine Kombination von zwei Bakterien aus, um die Gestaltbildung von *Ulva mutabilis*, d. h. das Wachstum und die Entwicklung der Blattform und des Haftorgans, in dieser »Dreiecksbeziehung« zu aktivieren. Während ein spezifisches Bakterium (Alphaproteobacterium) die Zellteilungen der Blattzellen und die Bildung eines typischen Blattes induziert, unterstützt das andere Bakterium (Bacteroidetes) die Zellwandbildung und löst eine Differenzierung derjenigen Zellen aus, mit denen sich die Alge am Untergrund festhält. Da die chemischen Verbindungen, auf denen die Kommunikation zwischen *Ulva* und ihren Bakterien (Cross-kingdom-Interaktionen) im Meer beruht, nur in sehr kleinen Mengen produziert werden, stellt ihre Identifizierung eine große Herausforderung dar.

Die neuen Forschungserkenntnisse werden u. a. die Voraussetzungen für die nachhaltige Bewirtschaftung algaler Aquakulturen schaffen. *Ulva* wurde von der Deutschen Botanischen Gesellschaft (Sektion Phykologie) zur »Alge des Jahres 2015« gewählt.

Summary

**Interactions of bacteria and algae:
the green alga *Ulva* (Chlorophyta) needs the right bacteria to be in good shape.**

The marine macro-alga *Ulva*, also called sea lettuce, lives closely associated with a complex microbial flora. In nature, many *Ulva* species grow rapidly and form green algal blooms ('green tides'), for example where untreated, nutrient-rich wastewater from agriculture and densely populated areas is flushed into the sea. Without the proper bacteria, *Ulva* does not grow and develops into a callus like morphotype. Upon addition of the essential marine bacteria, the complete morphogenesis can be resembled. Surprisingly, the combination of just two bacteria isolated from *Ulva* is sufficient to induce the morphogenesis and to set-up a tripartite community. The bacteria are essential helpers for the adhesion of *Ulva* to its substratum, biofilm formation, for its growth and finally the development of *Ulva*'s blade morphology. Whereas one bacterial (Alphaproteobacterium) strain induces the blade cell division of the alga, another specific one (Bacteroidetes) triggers the differentiation of basal cells into a so-called rhizoid which enables the fixation of the alga to the substratum. The same bacterium additionally ensures the correct structure of the algal cell walls. The cross-kingdom interaction of algae and bacteria is based mainly on chemical compounds released at very low concentration in the water body, which turns out to be very challenging for the structure elucidation. This research line will also pave the way for sustainable management of algal aquacultures. *Ulva* was selected 'Alga of the Year 2015' by the German Botanical Society (Phycology Section).

✉ Dr. Thomas Wichard, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Jena School for Microbial Communication, Lessingstraße 8, 07743 Jena;
Thomas.Wichard@uni-jena.de

Einleitung

Morphogenese in mehrzelligen Organismen ist ein streng kontrollierter Prozess, bei dem Zellen mit identischer genetischer Information durch ihre räumliche Beziehung zueinander definiert werden. Während der Morphogenese entwickeln diese Zellen verschiedene morphologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften, ausgelöst durch inter-, intra- und extrazelluläre Prozesse (Hurd et al. 2014). Die Umgebung einer Makroalge beeinflusst dabei durch die verschiedensten abiotischen und biotischen Stimuli ihr Wachstum und ihre Entwicklung.

In den letzten Jahren hat die grüne marine Makroalge *Ulva* (Chlorophyta) besonderes Interesse erfahren, weil sie sich in nährstoffreichen Gewässern von Küstengebieten stark vermehrt. Diese Algenblüten (»Green tides«) zeichnen sich durch einen starken sozio-ökonomischen Einfluss für die betroffenen Küstenregion wie z. B. in Portugal, Frankreich, Spanien und vor allem im asiatischen Raum aus (Abb. 1). *Ulva* besteht aus nur zwei Zellschichten mit einem oft gasgefüllten Innenraum. Daher treibt die frei schwimmende *Ulva* häufig auf der Wasseroberfläche. Die Artbestimmung von *Ulva* ist schwierig, da die Gattung eine sehr hohe morphologische Plastizität aufweist, die eine Zuordnung nach klassischen Gesichtspunkten häufig erschwert und molekularbiologische Methoden erfordert. Eine Art wurde sogar »*mutabilis*«, die Veränderliche, genannt, da Nachkommen von ihr mit besonders hoher Frequenz spontane Entwicklungsmutanten aufgrund einer unbekannt genen Instabilität bilden. Diese Beobachtungen machten bereits die norwegischen Pioniere der Algenkunde Bjørn Føyn und Arne Løvlie in den 1960er Jahren. Seit ihrer Erstbeschreibung (Føyn 1958) vor fast 60 Jahren befindet sich *Ulva mutabilis*, die ursprünglich in der Algarve in Portugal gesammelt wurde, in Kultur. Inzwischen wurden der Lebenszyklus und der Formwechsel genau studiert. Während der Wildtyp einen typischen salatförmigen Vegetationskörper ausbildet, zeigt die spontan auftretende Entwicklungsmutante »slender« eine schlanke, bandförmige Gestalt (Abb. 2). Dieser Gestaltwechsel ist bis heute unverstanden und fasziniert die Algenkundler, die mit molekularbiologischen Methoden versuchen, das Rätsel zu entschlüsseln. In unserem Labor kultivieren wir *Ulva mutabilis* unter standardisier-

ten Bedingungen (z. B. Licht/Dunkel-Rhythmus), sowohl unter bakterienfreien (= axenischen) Bedingungen als auch mit spezifischen Bakterien (= synthetische Mikrobiome), mit dem Ziel, die vielfältigen Cross-kingdom-Interaktionen zwischen *Ulva* und ihren assoziierten Bakterien besser zu verstehen.

Der Lebenszyklus von *Ulva* und die synchronisierte Gametenfreisetzung

Den Lebenszyklus von *Ulva* zu verstehen, war ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu standardisierten Laborkulturen. Alle *Ulva*-Arten sind isomorph, d. h., Gametophyt (1n) und Sporophyt (2n) haben die gleiche Gestalt, und wechseln zwischen biflagellaten (zweifach begeißelten) Gameten und quadriflagellaten (vierfach begeißelten) haploiden Zoosporen (= Zoiden) ab (Abb. 3). Die Entwicklung von Gametophyten und Sporophyten folgen dem gleichen Muster (Løvlie 1964). Interessanterweise entwickeln sich haploide Gametophyten nicht nur aus den Zoosporen, sondern auch aus ungepaarten Gameten. Fortpflanzungsaktivitäten finden meist in Randnähe der Wedel von *Ulva* oder an beschädigten Teilen der Thalli statt (Stratmann et al. 1996, Nilsen & Nordby 1975).

Die Umwandlung von Blattzellen in Gametangien/Sporangien wird durch zwei Sporulationsinhibitoren geregelt: einem Glykoprotein der Zellwand mit hohem Molekulargewicht und einem Faktor mit niedrigem Molekulargewicht, der zwischen den beiden Zellschichten von *Ulva* lokalisiert ist, wie in *U. mutabilis* und *U. linza* gezeigt wurde (Vesty et al. 2015, Stratmann et al. 1996). Die Gametogenese/Zoosporogenese wird induziert, wenn beide Sporulationsinhibitoren eine bestimmte Schwellenkonzentration unterschreiten oder nicht mehr wahrgenommen werden. Nach dem Entfernen eines dritten Faktors, des Schwärminhibitors, der sich während der Gametogenese im Medium ansammelt, werden die positiv phototaktischen zweifach begeißelten Gameten freigesetzt (Wichard &

Abb. 2. Die Gattung *Ulva* wächst bandförmig (»slender«) (links) oder wie ein Salatblatt (Mitte), wie dieses an der portugiesischen Küste gesammelte Exemplar. Im Labor kann die Interaktion zwischen jungen Algen und Bakterien unter standardisierten Bedingungen untersucht werden (rechts). – Fotos: Thomas Wichard.

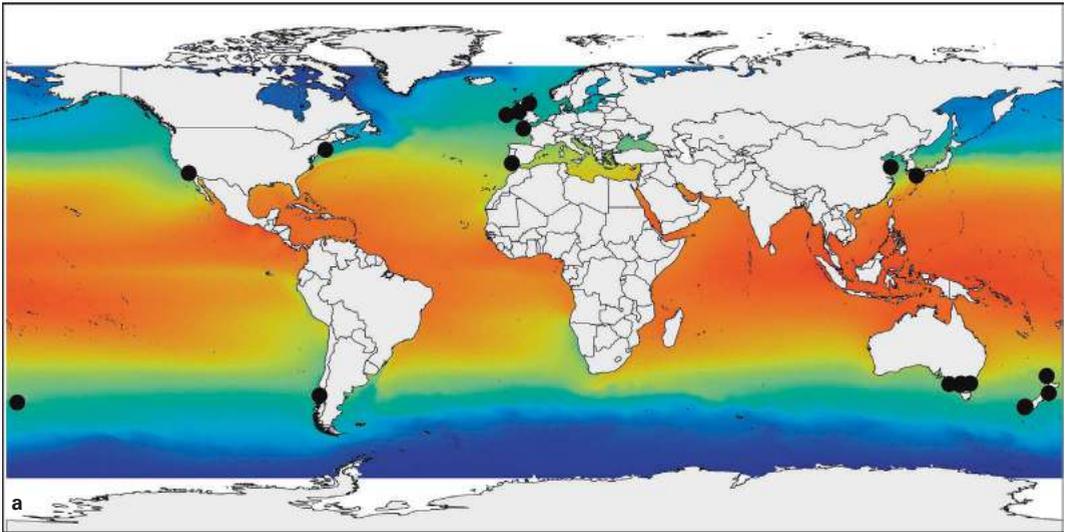
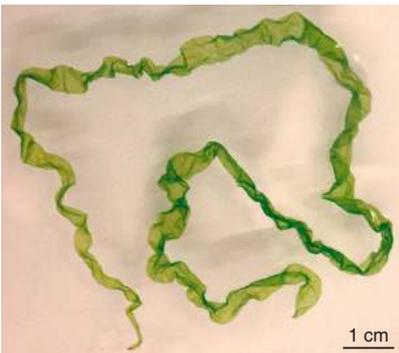


Abb. 1. a, Verbreitung der nah verwandten Arten *Ulva compressa* und *U. mutabilis*; b, Algenblüte in der Ria Formosa (Portugal). – a, © Wichard et al. (2015), CC-BY 4.0; b, Foto: Erik-Jan Malta (IFAPA, Spain).



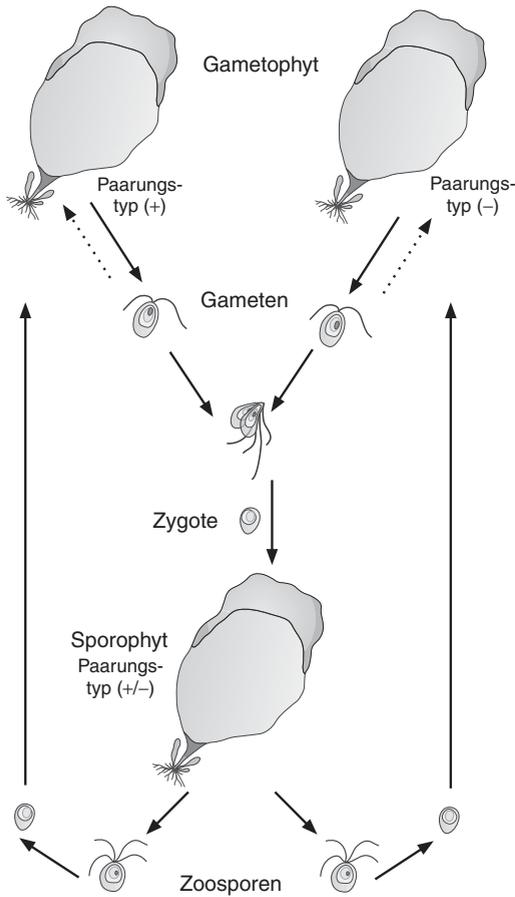


Abb. 3. Generationszyklus von *Ulva mutabilis*. Alle *Ulva*-Arten wechseln zwischen einer haploiden gametophytischen (n) und einer diploiden sporophytischen ($2n$) Lebensphase. Finden die von den Gametophyten freigesetzten zweifach begeißelten Gameten keinen Paarungspartner, entwickeln sie sich wieder in einen Gametophyten (gestrichelter Pfeil), ansonsten verschmelzen sie zu einer Zygote und bilden den Sporophyten. Der diploide Sporophyt bildet durch Meiose haploide vierfach begeißelte Zoosporen, die zu getrenntgeschlechtlichen Gametophyten heranreifen. – © Wichard (2015), CC-BY 4.0.

Oertel 2010, Stratmann et al. 1996). Manipulationen der an dem Lebenszyklus beteiligten Faktoren ermöglichen es uns nun, jederzeit die Bildung von Keimzellen zu induzieren. Damit war der Startschuss gegeben, *Ulva mutabilis* unter kontrollierten Laborbedingungen zu kultivieren und gezielt zu untersuchen. Nur so können wir verstehen, wie Bakterien mit *Ulva* in einer symbiontischen Beziehung leben.

Mutualistische Interaktionen zwischen Makroalgen und Bakterien

Joint et al. (2002) haben die erste Zell-zu-Zell-Kommunikation auf der Basis von Signalmolekülen zwischen einem Biofilm bildendenden Prokaryoten (*Vibrio anguillarum*) und einem marinen Eukaryoten (*Ulva*) nachgewiesen. In der Nähe eines bakteriellen Biofilmes und bei Anwesenheit von Quorum-Sensing-Signalen aus der Familie der *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL, Abb. 4a) reduzieren die beweglichen Zoosporen von *Ulva* ihre Geschwindigkeit und siedeln sich auf solchen Oberflächen an, die durch Vorbesiedlung von Bakterien eine optimale Anheftung der Alge ermöglichen (Biofouling). AHLs unterscheiden sich je nach Mikroorganismenart durch Variationen z. B. in ihrer Alkylkette. Eine komplexe Mischung dieser Substanzklasse wurde insbesondere bei marinen Alphaproteobakterien gefunden, die mit einem Wirtsorganismus assoziiert sind (Wagner-Dobler et al. 2005). Diese frei diffundierenden Signalstoffe werden von pflanzenassoziierten Bakterienzellen in kleiner Menge freigesetzt.

Ein weiteres faszinierendes Beispiel für die Bedeutung bakterieller Faktoren bei Makroalgen aus der Ordnung der Ulvales sind morphogenetische Substanzen. Diese bakteriellen Faktoren sind für die Zelldifferenzierung und die Morphogenese von *Monostroma oxyspermum* notwendig und mit Ausnahme von Thallusin (Abb. 4b) noch nicht identifiziert (Matsuo et al. 2005). Die Partner z. B. in einem Biofilm können aber auch Einfluss auf die Zelldichte anderer Organismen nehmen, indem sie Hemmstoffe oder antibiotisch wirkende Substanzen produzieren. Ein gutes Beispiel dafür ist der Thallus von *Ulva*, der im Vergleich zum Rhizoid weit weniger mit Bakterien besiedelt ist. Einige Arten wie z. B. *U. reticulata* scheinen außerdem resistent gegenüber Biofouling durch Pathogene, Tunicaten (Manteltiere) oder Polychäten (Vielborster) zu sein. Diese Beobachtungen wurden erstmals von Harder und Qian (2000) als chemische Verteidigung von *Ulva* spp. gegen Biofouler diskutiert. Bis heute sind die Substanzen nicht eindeutig identifiziert worden. *Ulva* produziert darüber hinaus zum Beispiel Bromoform (Abb. 4c) (Manley & Barbero 2001) und mehrfach ungesättigte Aldehyde (Abb. 4d) (Alsufyani et al. 2014), die möglicherweise eine bakterizide Wirkung zeigen. Weitere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass aktive

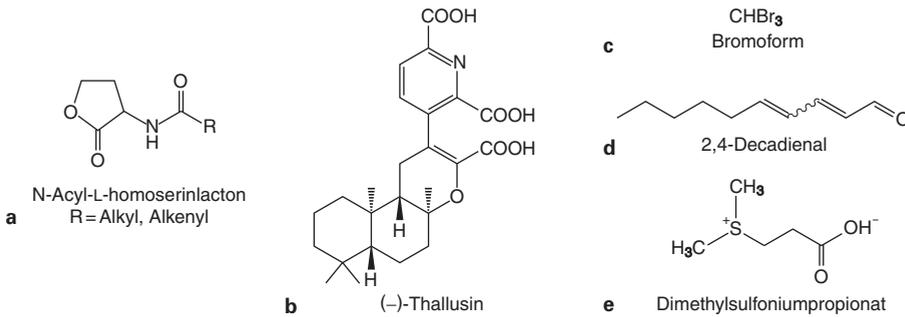


Abb. 4. Strukturformeln bakterieller Metabolite mit Quorum-Sensing- (a) oder morphogenetischer (b) Aktivität sowie algaler Metabolite mit bakterizider Wirkung (c, d) und chemotaktischer Wirkung (e). – Zusammenstellung: A. Weiß & T. Wichard, nicht publizierte Daten.

Substanzen in der Chemosphäre von *Ulva* eher von symbiontischen Bakterien als von der Alge selbst produziert werden (Abb. 5).

Ulva lebt also in enger Gemeinschaft mit einer komplexen bakteriellen Begleitflora, mit der sie interagiert und ohne die sich die Alge nicht normal entwickeln kann. Diese Kommunikation geschieht im Meer vorwiegend mithilfe chemischer Verbindungen. Bakterien und Algen »senden« chemische Signale aus, die von dem jeweils anderen Partner erkannt und verarbeitet werden. Die chemisch-symbiontischen Wechselwirkungen von *Ulva* mit ihrer Bakterienflora wecken seit Jahren das Interesse der marinen Ökologen und Chemiker an diesen interaktiven Mechanismen. Bereits vor mehr als 80 Jahren postulierten Algenforscher, dass ein normales Wachstum von *Ulva* nicht ohne das Hinzufügen von Bodenextrakten (sog. Erdschreiber-Medium) möglich sei (Hurd et al. 2014). Seit dieser Zeit wurden mehrere synthetische Medien entwickelt, um den Nährstoffbedarf von Makroalgen zu studieren und eine normale Keimung und adulte Entwicklung von *Ulva* zu ermöglichen (Føyn 1934, Provasoli 1958).

Letztendlich zeigte es sich aber, dass spezifische Bakterien, isoliert von der algalen Oberfläche, für die unterschiedliche Entwicklung von *Ulva* verantwortlich sind. Ohne spezifische Bakterien bzw. unter axenischen Bedingungen entwickelt *Ulva* einen kallusartigen Morphotyp, der oft als atypisch, aber lebensfähig beschrieben wird. Diese kissenförmige Gestalt besteht aus einreihigen zweigeteilten Filamenten und missgebildeten Zellwänden (Provasoli 1958, Spoerner et al. 2012).

Um solche Zusammenhänge untersuchen zu

können, nutzen wir bakterienfreie Kulturen von *Ulva* und machen uns dabei die Besonderheit der beweglichen Keimzellen zunutze (Spoerner et al. 2012). Die zweifach begeißelten Gameten schwimmen mit hoher Geschwindigkeit einer Lichtquelle entgegen und lassen dabei alle Bakterien hinter sich. Die auf diese Weise bakterienfreien Gameten entwickeln sich nur sehr langsam in einen undifferenzierten Zellhaufen, der die normale Gestalt von *Ulva* nicht mehr erkennen lässt und Missbildungen der Zellwand unter dem lichtmikroskopischen Bild aufweist (Abb. 6e). Durch den Einsatz von Antibiotika waren derartige bakterienfreie Kulturen bisher nicht zu erreichen. Mit diesen axenischen Kulturen lassen sich nun chemische Komponenten identifizieren, die entweder aus Bakterien stammen und nach Zugabe zu den Gameten die Entwicklung und Morphogenese von *U. mutabilis* beeinflussen, oder die aus *Ulva* stammen und das bakterielle Wachstum beeinflussen.

Durch die erneute Zugabe der notwendigen marinen Bakterien, einem *Roseobacter* sp. (Genbank EU359909) und einem *Cytophaga* sp. (Genbank EU359911), entwickelt *Ulva* wieder ihr normales Aussehen (Spoerner et al. 2012). Die beiden Bakterienstämme wurden kürzlich taxonomisch als *Roseovarius* sp. und *Maribacter* sp. neu eingeordnet (Grueneberg et al. 2016). Da die Beschreibung der Isolate allerdings noch nicht abgeschlossen ist, wird hier vorerst an den alten Namen festgehalten. Für eine große Überraschung sorgte, dass diese zwei spezifischen Bakterienarten ausreichen (Abb. 6), um die Gestaltbildung von *Ulva mutabilis* in einer »Dreiecksbeziehung« zu aktivieren (Wichard et al. 2015).

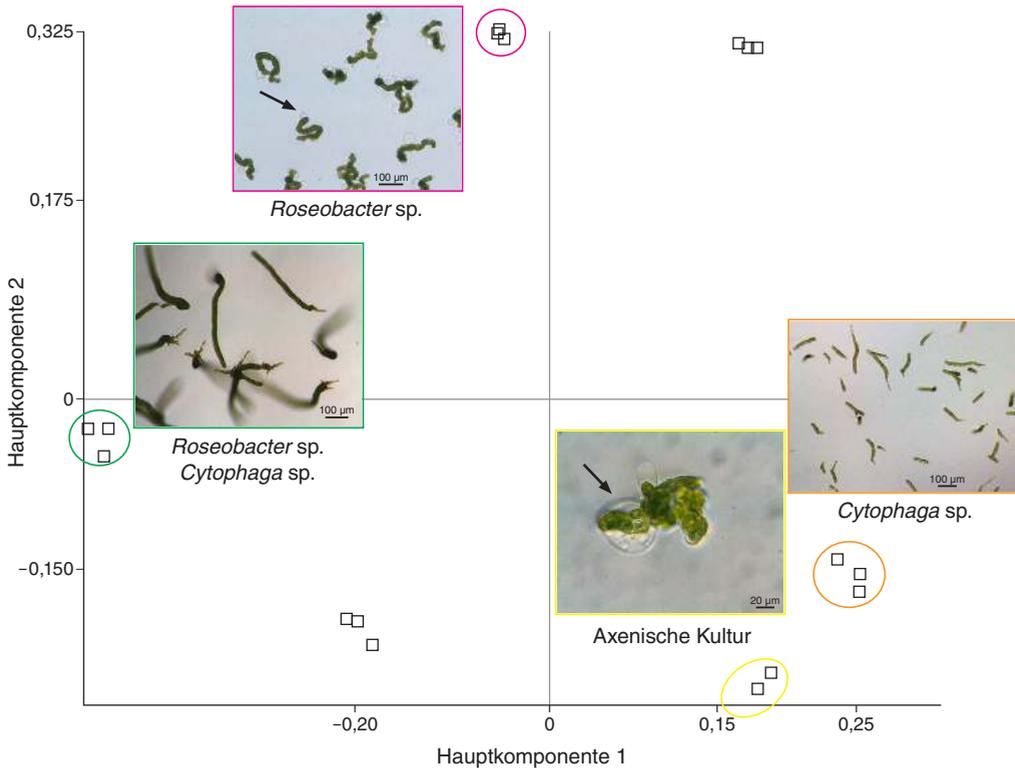


Abb. 5. Hauptkomponentenanalyse des Exometaboloms von *Ulva* und ihren assoziierten Bakterien. Axenische Kulturen von *Ulva* wurde mit unterschiedlichen Bakterien inokuliert. Repräsentative Bilder von zwei Wochen alten Keimlingen sind gezeigt. Algale und bakterielle Metaboliten wurden aus dem Kulturüberstand der verschiedenen Behandlungen extrahiert, mittels Massenspektrometrie analysiert und durch die Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Datenpunkte ohne Beschriftung beziehen sich auf Inokulationen ohne morphogenetische Wirkung auf *Ulva*. Die Hauptkomponenten 1 und 2 erklären 30 % bzw. 20 % der Varianz. – T. Alsufyani & T. Wichard, nicht publizierte Daten.

Thalli des Algenwildtyps bestehen aus einem kleinen Anhefteorgan, das zwei differenzierte Zelltypen enthält (»Stamm-« und »Rhizoidzellen«) und einem großen salatähnlichem Blatt, das aus nur einem Zelltyp besteht (»Blattzellen«). In der Symbiose scheidet der *Cytophaga* sp. einen phytohormonartigen Stoff aus, der für die Differenzierung von »Stamm-« und »Rhizoidzellen« essenziell ist, das Streckungswachstum von Blattzellen regelt und die Zellwandbildung unterstützt (Abb. 6b,d). Der *Roseobacter*-Faktor dagegen fördert die Teilung und Differenzierung der Blattzellen und regelt die Ausbildung der charakteristischen Blattform (Abb. 6a,c). Beide an das Medium abgegebenen Faktoren führen nur zusammen zur normalen Thallusentwicklung. Die Substanzen (= Morphogene) sind keine Medienbestandteile oder bekannten Pflanzen-

wachsstoffe. Die gleichen spezifischen Bakterien induzieren den prädisponierten Morphotyp, z. B. den Wildtyp oder den »slender«-Typ (Spoerner et al. 2012). Nach jetzigem Forschungsstand sind die Bakterien also nicht in der Lage, das inhärente Programm der Morphogenese von *Ulva* zu kontrollieren, aber sie sind essenziell für das algale Wachstum, die Morphogenese und die Biofilmbildung am Anhefteorgan von *Ulva*.

Aufklärung der Kommunikation zwischen Bakterien und Algen: methodischer Ansatz

Um die vielfältigen Wechselwirkungen weiter zu beschreiben, sollte ein robuster, zuverlässiger und wiederholbarer Versuchsaufbau gewährleistet sein. Dazu gehört die Herstellung axenischer

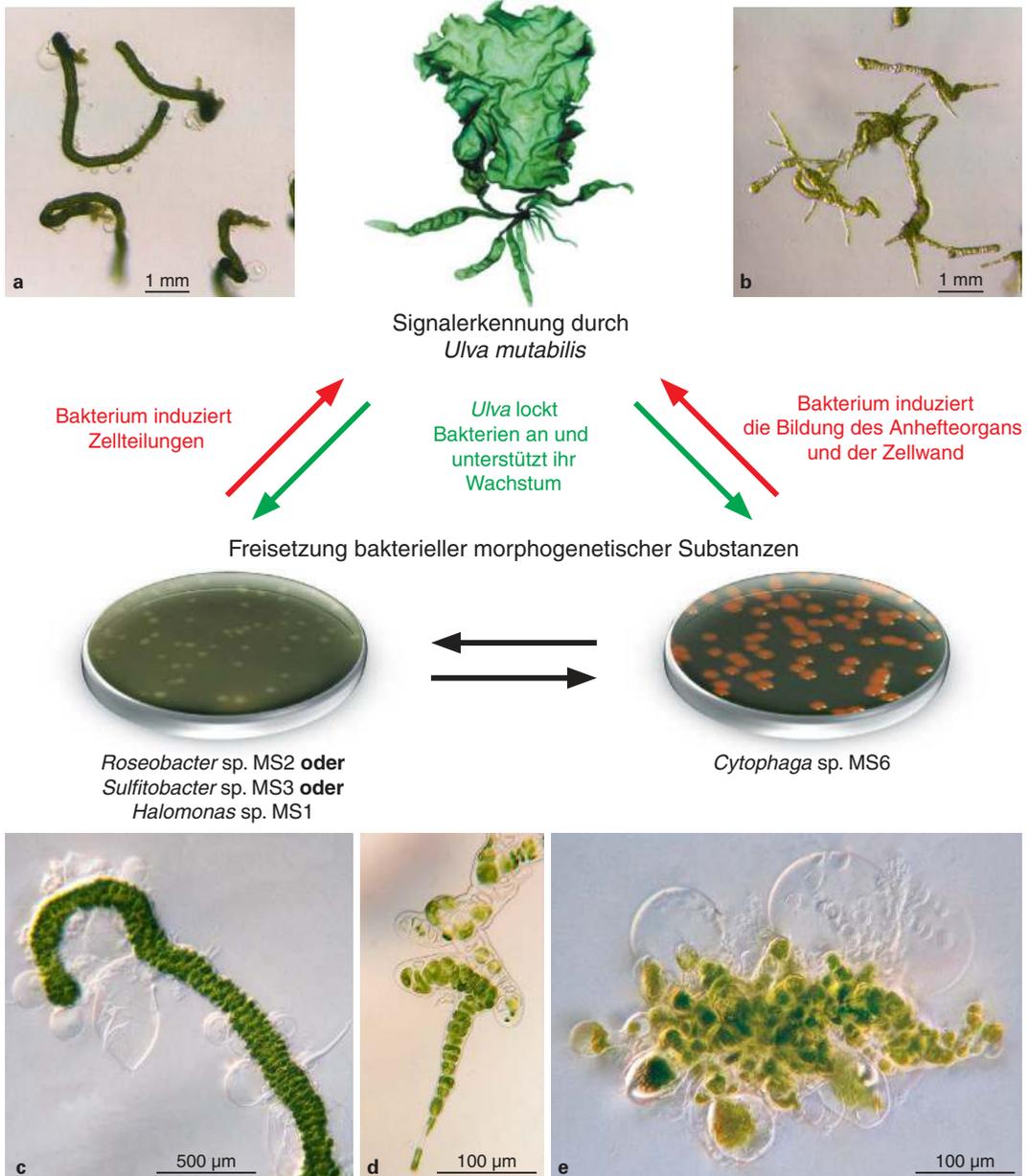


Abb. 6. Dreiecksbeziehung zwischen *Ulva mutabilis* und den Bakterien *Roseobacter* sp. und *Cytophaga* sp. Beide Bakterien setzen morphogenetische Substanzen frei, die die Entwicklung von *Ulva* beeinflussen. Der *Roseobacter* unterstützt die Zellteilungen (a, c), der *Cytophaga* induziert die Zellwand- und die Rhizoidbildung des Haftorgans (b, d). Axenische Kulturen entwickeln sich in einen undifferenzierten Zellhaufen (e). Zwei Wochen alte Keimlinge sind gezeigt. – © Wichard (2015), CC-BY 4.0.

Kulturen (s.o.), die Isolierung und Kultivierung von Bakterien, von denen die meisten womöglich nicht (ohne Wirte/Symbionten) kultivierbar sind, und ein Biotest, um die morphogenetischen Ver-

bindungen zu bestimmen, beispielsweise durch fraktionierte Aufreinigung (Matsuo et al. 2005, Spoerner et al. 2012) oder durch die Erforschung des Metaboloms (comparative metabolomics)

(Prince & Pohnert 2010, Alsufyani & Wichard 2014). Unzureichend standardisierte Experimente könnten zu widersprüchlichen Beobachtungen verschiedener Forschungsgruppen führen und die Untersuchung speziesspezifischer Wechselwirkungen zwischen *Ulva* und ihren assoziierten Bakterien erschweren. Daher schlage ich mehrere Punkte vor, die erfüllt sein sollten, um verlässliche Daten auf der Basis von Biotests zu erhalten und um die Chemosphäre von *Ulva*, in dem die chemische Interaktionen zwischen den Organismen stattfinden, zuverlässig untersuchen zu können (Wichard 2015).

1. Es sollten axenische Algenkulturen verwendet werden, die mit den zu testenden Bakterien inokuliert werden. Unbestimmte, eventuell im Küstengebiet frisch gesammelte Isolate stellen kein Ausgangsmaterial dar, das zu reproduzierbaren Beobachtungen führt. Die Axenität sollte vor den Biotests mit Hilfe von Polymerasekettenreaktion-basierten Experimenten überprüft werden.
2. Die zusätzlichen Zugabe von (unbekannten) Algenverbindungen in das Wachstumsmedium der Bakterien sollte getestet werden, um ihre Kultivierung zu ermöglichen.
3. Zweikammerkultursysteme sollten benutzt werden, um die Cross-kingdom-Interaktionen über diffusionsfähige Verbindungen im Wasser zu zeigen (Spoerner et al. 2012, Wichard 2015).

Chemotaxis von symbiontischen Bakterien und Biofilmbildung

Unter Chemotaxis versteht man die Beeinflussung der Fortbewegungsrichtung von Lebewesen durch Stoffkonzentrationsgradienten. Wird die Bewegung in Richtung höherer Konzentrationen des Stoffes gesteuert, so spricht man von positiver Chemotaxis und nennt den entsprechenden Metaboliten Lockstoff. *Roseobacter* sp. wird von den Rhizoidzellen der Algenkeimlinge auf diese Weise chemotaktisch angezogen und siedelt um die spätere Anheftestelle der Alge am Substrat an, wo er gemeinsam mit *Cytophaga* sp. einen Biofilm ausbildet (Abb. 7). In diesem Zusammenhang wird in unserem Labor auch die Bedeutung von Dimethylsulfoniumpropionat (Abb. 4e), das in großen Mengen von *Ulva* produziert und an das Medium abgegeben wird,

untersucht (R. W. Keßler, A. Weiß, S. Kügler & T. Wichard, nicht publizierte Daten). Interessanterweise zeigen unsere Vorversuche auch, dass sich beide Bakterienspezies in ihrem Wachstum durch niedermolekulare Faktoren selbst regulieren.

Spoerner et al. (2012) führte ein Funktionsmodell ein, um die vielfältigen Interaktionen zusammenfassend zu beschreiben: Das stäbchenförmige, unbegeißelte Bakterium *Cytophaga* sp. könnte durch zufälligen direkten Kontakt mit der Algenzelloberfläche rekrutiert werden, auf der es sich durch Gleiten auf einer Schleimschicht weiterbewegt. *Cytophaga*-Arten sind für ihre Fähigkeit bekannt, spezifische Oberflächen zu erkennen und an ihnen zu haften. *Cytophaga* könnte dann epiphytisch Algenpolysaccharide verstoffwechseln oder sogar durch Einstülpung (Invagination) in die Zellwand eindringen. Tatsächlich wurden per Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kürzlich Bakterien in der Zellwand von *Ulva flexuosa* subsp. festgestellt (Messyasz et al. 2013). Zur Bildung und Aufrechterhaltung dieser Cross-kingdom-Interaktionen müssen sich Rhizoidzellen mit einem adhäsiven Polyglykoprotein am Substrat verankern (Callow & Callow 2006). Die dafür nötige Rhizoidbildung wird von dem *Cytophaga* sp. induziert. Anschließend sondert die keimenden *Ulva* eine diffusionsfähige Substanz ab, wie beispielsweise einen bestimmten Nährstoff oder einen Regulationsfaktor. Motile *Roseobacter*-Zellen sind in der Lage, auf die Signale chemotaktisch zu reagieren; sie bewegen sich in Richtung der Keimlinge und siedeln in der Umgebung der Haftscheibe (A. Weiß & T. Wichard, nicht publizierte Daten). Unter diesen kontrollierten Bedingungen für *U. mutabilis* führt die Kommunikation zwischen zuerst axenischen, sehr jungen Keimlingen und Bakterien zur Bildung eines Biofilms in seiner einfachsten Form (Abb. 7). Mehrere chemische Wechselwirkungen wurden für die Bildung eines Biofilms und die anschließende Induktion der Algenmorphogenese als notwendig vorgeschlagen (Spoerner et al. 2012). Dieses zwar vereinfachte, aber standardisierbare System lässt sich problemlos auf weitere Forschungsaspekte im Zusammenhang mit der chemische Verteidigung der Dreiecksbeziehung gegenüber Fraßfeinden oder der Wirkungen von sich verändernden Umgebungsbedingungen auf die Gemeinschaft anpassen.

Morphogene im natürlichen Habitat von *Ulva*

Im Rahmen des EU-Infrastrukturprogramms ASSEMBLE¹ wurden wichtige Erkenntnisse zur Planung und Durchführbarkeit von Freilandversuchen an der Südküste von Portugal gewonnen. Der Standort der marinen Station der University of Algarve (Faro, Portugal) in der Lagune Ria Formosa hat sich dabei für unsere Forschung als günstig erwiesen. Zum einen war von dem norwegischen Botaniker Føyn diese Gegend bereits im Jahr 1952 beprobt und *U. mutabilis* hier erstmalig beschrieben worden. Die von Føyn (1958) beschriebene Spezies *U. mutabilis* haben wir nach eingehender Beprobung an den Stränden der Ria Formosa (Faro) (wieder) gefunden und mittels entsprechender DNS-Sequenzanalysen identifiziert.

Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass das steril filtrierte Wasser der Lagune nicht nur während der Green tides, sondern auch unter ganz normalen Bedingungen die Faktoren enthält, die zu einer vollständigen Morphogenese von *U. mutabilis* aus einer axenischen Kultur notwendig sind (Grueneberg et al. 2016). Es handelt sich dabei, wie schon vorher gezeigt, um diffusionsfähige morphogenetische Substanzen. Durch einen Biotest kann nach verschiedenen Aktivitäten, die eher auf *Roseobacter* sp. (Zellteilungen) bzw. auf *Cytophaga* sp. (Zelldifferenzierung, Bildung eines Haftungsorgans) zurückzuführen sind, unterschieden werden (siehe Abb. 6). Für den »*Roseobacter*-Faktor« konnten wir für jede Probenahmestelle (1–11) innerhalb, aber nicht außerhalb, der Lagune eine positive Wirkung feststellen (Abb. 8). Das bedeutet, es ist nicht so entscheidend, ob die Alge direkt von den Bakterien umgeben bzw. mit ihnen assoziiert ist, oder ob die morphogenetisch aktiven Substanzen auch an anderer Stelle innerhalb des Habitats gebildet werden. Bei dem »*Cytophaga*-Faktor« verhält es sich etwas anders. *Cytophaga* wächst bevorzugt auf Zelloberflächen, dementsprechend haben wir nur an ausgewählten Standorten die Aktivität nachweisen können. Die weitere Forschung müsste zeigen, dass der »*Cytophaga*-Faktor« besonders dort in größerer Konzentration

vorhanden ist, wo *Ulva* mit ihren assoziierten Bakterien in der Lagune auftritt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass wir die Wirkung der mit *Ulva* assoziierten Bakterien durch Extrakte ersetzen können. Zurzeit laufen die Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Morphogene, deren Aktivität auch im natürlichen Meerwasser gefunden wurde. Dies ist durchaus problematisch für chemisch-ökologische Experimente, in denen filtriertes natürliches Meerwasser zur Kultivierung von Makroalgen eingesetzt wird. Die entsprechenden Arbeitsgruppen beachten normalerweise nicht, dass bereits hochaktive organische Substanzen in dem steril filtrierten Medium vorhanden sein könnten.

Ulva als genetisches System

In unserem Labor werden eine Reihe natürlicher Entwicklungsmutanten gezüchtet, die sich in ihrer Thallusform (»slender«, »long«, »bubble«) von dem Wildtyp der »Salatblatt«-Form unterscheiden (Løvlie 1968). Um solche Entwicklungsmutanten oder die algalen Interaktionen mit ihren assoziierten Bakterien zu studieren, wurde im Labor von Prof. Dr. Wolfgang Oertel (Universität Regensburg) ein Transformationssystem für *Ulva* aufgebaut, das in unserem Labor nun weiterentwickelt wird. Die hierbei verwendete ungerichtete Insertionsmutagenese ist insbesondere für Gene geeignet, die für einen selektierbaren Phänotyp wie die fehlende Interaktion mit Bakterien codieren. Nach Mutagenese besteht nun die erfolgversprechende Möglichkeit, in den Entwicklungsmutanten von *U. mutabilis* defekte Gene zu identifizieren und die Mutante durch Transformation mit Plasmiden aus einer genomischen Wildtyp-Genbibliothek in einem geeigneten »shuttle«-Vektor genetisch zu komplementieren (Oertel et al. 2015).

Ausblick

Ulva begeistert Forscher wegen ihrer vielen noch unentdeckten Geheimnisse. Im Unterschied zu etablierten Modellsystemen ist bei *Ulva* noch viel Grundlagenforschung zu leisten. Erst kürzlich wurde *Ulva* von der Deutschen Botanischen Gesellschaft zur »Alge des Jahres 2015« (Sektion Phykologie) gewählt. Insbesondere erwartet die wissenschaftliche Gemeinschaft nun neue Impulse für ihre Forschungsaktivitäten durch

1 Association of European Marine Biological Laboratories, www.assemblemarine.org.

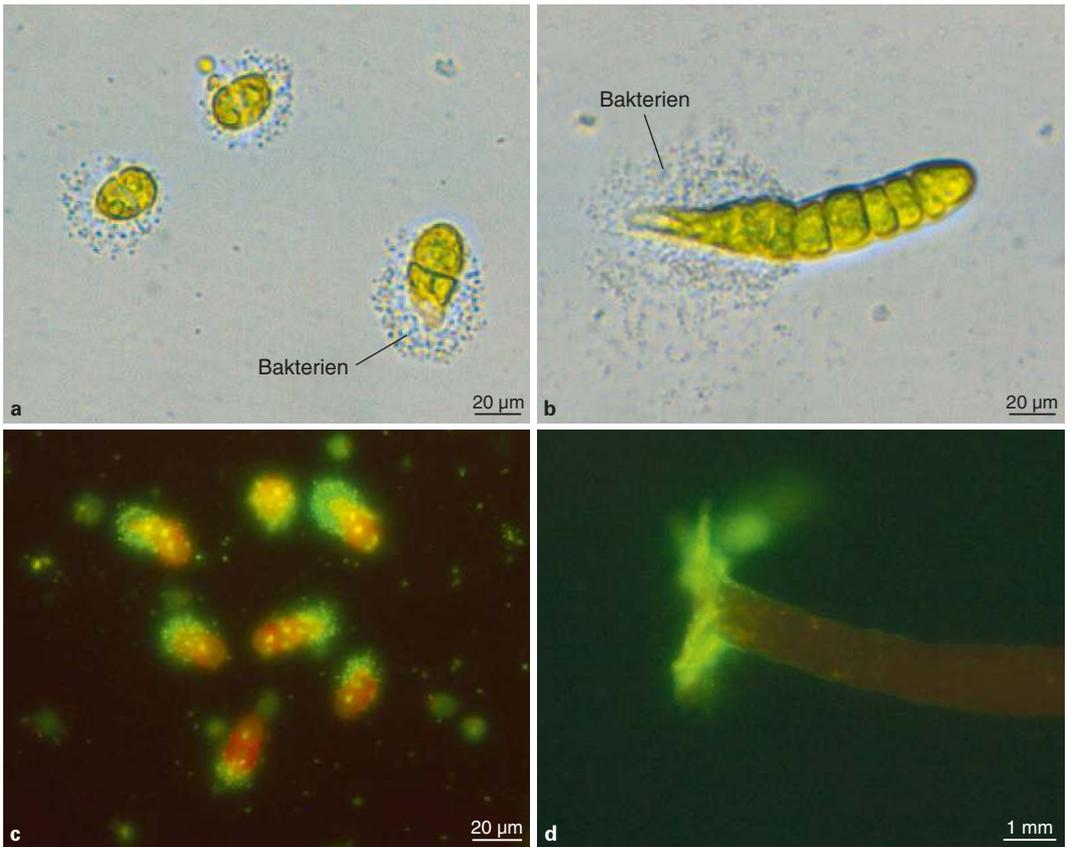


Abb. 7. Biofilmbildung: Chemotaktische Wirkung von algalen Substanzen im Bereich des Rhizoids von *Ulva mutabilis*. Licht- und fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Keimlings (a: 4 Tage, b: 6 Tage alt) und nach Anfärbung der bakteriellen DNS mit dem Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (c: 4 Tage, d: 3 Wochen alt). – © Wichard (2015), CC-BY 4.0.

das zurzeit laufende *Ulva*-Genomprojekt (Natural Environment Research Council, GB), durch das neu entwickelte Transformationssystem für *Ulva* (Oertel et al. 2015) und z. B. durch kombinierte Transkriptom/Metabolom-Studien. Die Genomdaten verschiedener Morphotypen (»slender«, Wildtyp) werden uns einen Überblick über die unterschiedlichen Entwicklungsprogramme verschaffen. Das ambitionierte Projekt wird dazu beitragen, die chemische Ökologie der vielfältigen Interaktionen zwischen *Ulva* und ihrer assoziierten Bakterien auf genetischer Basis zu entschlüsseln.

In den letzten Jahren erlangte die Makroalge *Ulva* in den Medien immer wieder besondere Aufmerksamkeit, da sie sich massenhaft in Form großflächiger Algenblüten in nährstoffreichen

Küstengebieten in Europa und Asien ausbreitete. Intensive Nutzung küstennaher Agrarflächen und die Zufuhr ungeklärter Abwässer in Küstengebieten wirkt sich dabei verstärkend auf die Verbreitung von *Ulva* aus (Abb. 1b). Lagert sich *Ulva* im Uferbereich ab, bilden sich Algenmatten aus, die die darunter liegenden Schichten von der Sauerstoffzufuhr und Sonneneinstrahlung abschneiden und damit ihre Fauna und Flora gefährden.

Die schnelle Aufnahme von Nährstoffen lässt die Forscher aber auch über eine gezielte Anwendung für *Ulva* als Biofilter bei der Abwasserreinigung und für die Wiederaufbereitung eutrophierter Abwässer nachdenken. Diese Umweltrelevanz sorgt für großes Forschungsinteresse bei Ökologen, Pflanzenphysiologen und

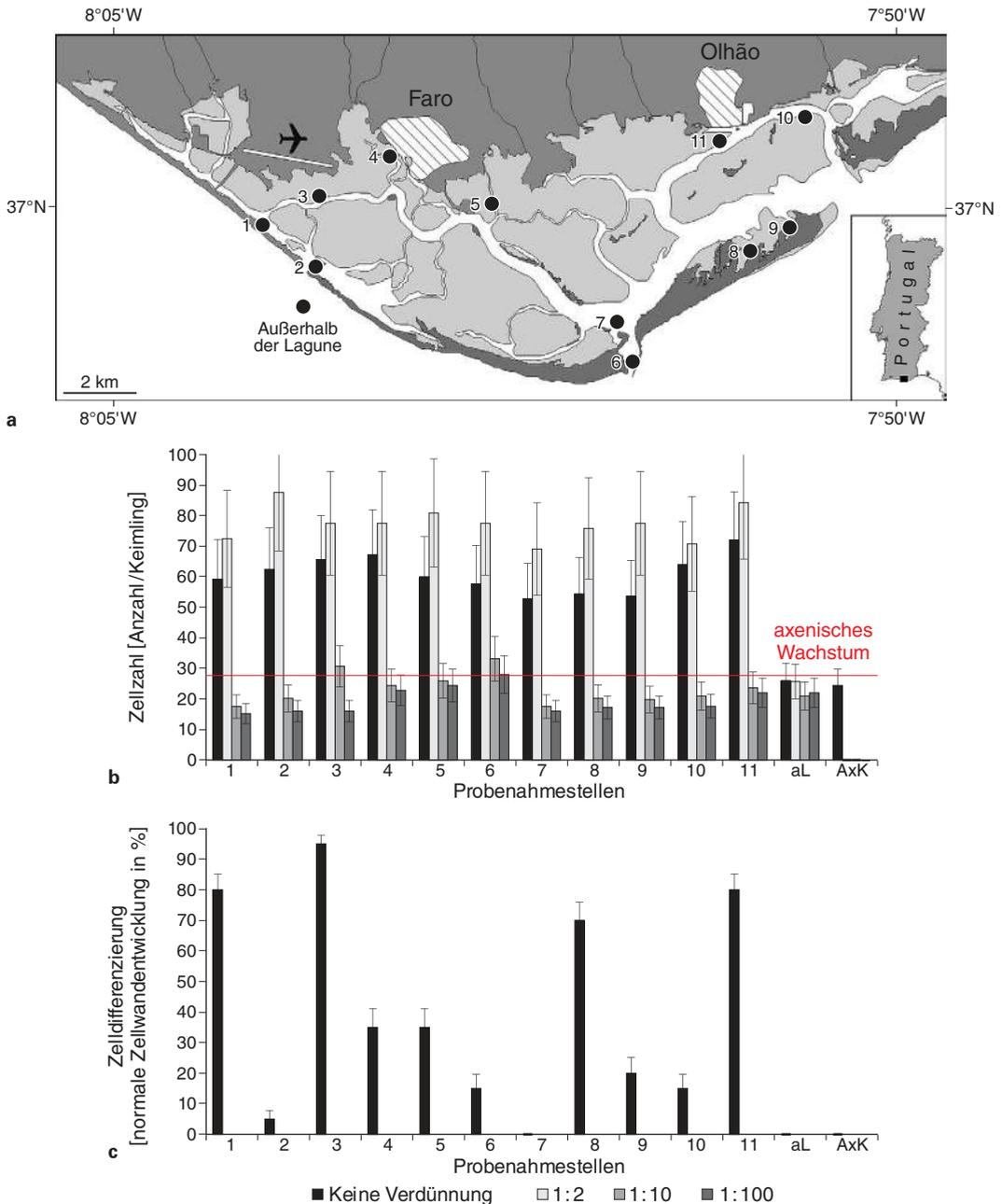


Abb. 8. Morphogenetische Substanzen in der Lagune Ria Formosa (Portugal); **a**, Skizze der Ria-Formosa-Lagune bei Faro, Portugal, mit der Lage der Beprobungsstandorte (1–11) sowie einem Kontrollstandort außerhalb der Lagune. Wirksamkeit des »*Roseobacter*-Faktors« (**b**) und des »*Cytophaga*-Faktors« (**c**) im Biotest: Induzierte Zellteilungen (**b**, durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Keimling) bzw. Zelldifferenzierung (**c**, Anteil von Algen mit normaler Zellwandentwicklung, in %) nach Zugabe von sterilem Meerwasser von den Probenahmestellen 1–11 und von dem Standort außerhalb der Lagune (aL) zu axenischen Kulturen (AxK) von *Ulva mutabilis*; — maximales Wachstum unter axenischen Bedingungen; Konfidenzintervalle (**b**; $P = 0,95$) bzw. Standardabweichung (**c**) bei $n = 60$. – © Grueneberg J. et al. (2016), CC-BY 4.0.

Chemikern. In rezirkulierenden Aquakulturen wird beispielsweise das Abwasser aus Fischzuchten in Algenbecken geleitet, in denen *Ulva* z. B. Nitrate aufnimmt und somit zur ökologischen und nachhaltigen Durchführung von Aquakulturen beiträgt. Dieser vorgeschlagene Ansatz zur Wiederaufbereitung von Abwässern setzt allerdings voraus, dass *Ulva* im vegetativen Stadium kontinuierlich gehältert werden kann, da die Bildung der Keimzellen zum Verlust der Biomasse führt.

Auch andere Makroalgen werden daraufhin untersucht, welche Faktoren und bakteriellen Begleiter deren Gestalt, Entwicklung und Fertilität beeinflussen. Mehr als 35 Forscherteams aus ganz Europa haben sich zu dem Netzwerk »Phycomorph« zusammengeschlossen. Seit 2014 erhalten sie eine Forschungsförderung der europäischen Gemeinschaft (European Cooperation in Science and Technology Association, COST) mit dem Ziel, die Fertilität, Reproduktion und Entwicklung von Makroalgen unter der Berücksichtigung neuester Methoden zu erforschen.

Fazit

Ulva mutabilis eignet sich hervorragend zur Erforschung der Bakterien-Algen-Interaktionen sowie zur Untersuchung gezielter entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Der Modellorganismus zeichnet sich durch zahlreiche Eigenschaften aus, die ihn ideal für eine systematische Erforschung innerhalb der Makroalgen machen:

- **Generationszyklus:** Der haplo-diplonte Lebenszyklus lässt sich vollständig im Labor unter kontrollierten Tag/Nacht-Bedingungen (17 h/7 h) bei 20 °C untersuchen. Insbesondere kann der haploide Gametophyt weiterverbreitet werden. Der Generationszyklus der wildtypischen Form beträgt (nur) fünf Wochen.
- **Symbiose:** *Ulva* entwickelt sich nur in Anwesenheit geeigneter Bakterien normal.
- **Induzierbare Sporulation:** Die Bildung und massenhafte Freisetzung von Keimzellen kann induziert werden. Die Gameten zeigen eine starke positive Phototaxis, die zur Abtrennung von Bakterien und zur Herstellung axenischer Kulturen genutzt wird.
- **Axenische Kultivierung:** Unter axenischen Bedingungen beobachtet man keine Zelldifferenzierung und nur langsames kallusähnliches Wachstum. Dadurch lassen sich gezielt Bakterien-Algen-Interaktionen und

insbesondere die durch Bakterien induzierte Morphogenese untersuchen.

- **Synthetisches Mikrobiom:** Die Morphogenese axenischer Kulturen wird durch die Zugabe spezifischer Bakterien wiederhergestellt (»Dreiecksbeziehung«).
- **Isolation von Morphogenen:** Bakterien setzen niedermolekulare Stoffe frei, die aus den Kulturüberständen aufgereinigt werden können, aber auch *in natura* nachgewiesen wurden, und die algele Morphogenese in Abwesenheit der Bakterien vollständig induzieren.
- **Einfache Thallus Organisation:** Der Thallus besteht aus nur wenigen Zelltypen (Blatt-, Stamm- und Rhizoidzellen).
- **Genetik:** Ein effizientes Transformatio-nsystem steht für die genetische Manipulation von *Ulva* zur Verfügung. Das Genom von *U. mutabilis* wird zurzeit annotiert.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Oertel (Universität Regensburg), der mich in die Biochemie und Biologie von *Ulva* eingeführt hat, für die zahlreichen sehr fruchtbaren Diskussionen in den letzten 15 Jahren. Ich danke meinen Doktorandinnen und Doktoranden, Taghreed Alsufyani, Anne Weiß, Ralf Kessler und Jan Grüneberg sowie meinen Kooperationspartnern in Portugal (CCMAR, Faro), Dr. Rodrigo Costa und Dr. Aschwin Engelen, für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Für seine großartige Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Georg Pohnert (Universität Jena). Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 1127 ChemBioSys), dem deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und der Jena School for Microbial Communication (JSMC) danke ich für die großzügige Unterstützung unserer Arbeiten.

Literatur

- Alsufyani, T. 2014. Metabolite profiling of the chemosphere of the macroalga *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) and its associated bacteria. – Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Alsufyani, T., A. H. Engelen, O. E. Diekmann, S. Kuegler & T. Wichard. 2014. Prevalence and mechanism of polyunsaturated aldehydes production in the green tide forming macroalgal genus *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). – Chemistry and Physics of Lipids, 183: 100–109.

- Callow, J. A. & M. E. Callow 2006. The spore adhesive system of *Ulva*. – In: Smith, A. M. & J. A. Callow (eds.): *Biological Adhesives*. Springer, Berlin: 63–78.
- Føyn, B. 1934. Lebenszyklus und Sexualität der Chlorophyceae *Ulva lactuca* L. – *Archiv für Protistenkunde*, 83: 154.
- 1958. Über die Sexualität und den Generationswechsel von *Ulva mutabilis*. – *Archiv für Protistenkunde*, 102: 473–480.
- Grueneberg, J., A. H. Engelen, R. Costa & T. Wichard. 2016. Macroalgal morphogenesis induced by waterborne compounds and bacteria in coastal seawater. – *PLoS ONE* 11(1): e0146307; doi:10.1371/journal.pone.0146307.
- Harder, T. & P. Y. Qian. 2000. Waterborne compounds from the green seaweed *Ulva reticulata* as inhibitive cues for larval attachment and metamorphosis in the polychaete *Hydroides elegans*. – *Biofouling*, 16(2–4): 205–214.
- Hurd, C. L., P. J. Harrison, K. Bischof & C. S. Lobban. 2014. *Seaweed ecology and physiology*. – 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 562 p.
- Joint, I., K. Tait, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Milton, P. Williams & M. Camara. 2002. Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. – *Science*, 298(5596): 1207.
- Løvlie, A. 1964. Genetic control of division rate and morphogenesis in *Ulva mutabilis* Føyn. – *Comptes-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 34: 77–168.
- 1968. On the use of a multicellular alga (*Ulva mutabilis* Føyn) in the study of general aspects of growth and differentiation. – *Nytt Magasin for Zoologi*, 16: 39–49.
- Manley, S. L. & P. E. Barbero. 2001. Physiological constraints on bromoform (CHBr₃) production by *Ulva lactuca* (Chlorophyta). – *Limnology and Oceanography*, 46(6): 1392–1399.
- Matsuo, Y., H. Imagawa, M. Nishizawa & Y. Shizuri. 2005. Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. – *Science*, 307(5715): 1598.
- Messyasz, B., J. Czerwik-Marcinkowska, A. Massalski, B. Uher, A. Rybak, L. Szendzina & M. Pikosz. 2013. Morphological and ultrastructural studies on *Ulva flexuosa* subsp. pilifera (Chlorophyta) from Poland. – *Acta Societas Botanicorum Poloniae*, 82(2): 157–163.
- Nilsen, G. & O. Nordby. 1975. Sporulation inhibiting substance from vegetative thalli of green alga *Ulva mutabilis* Føyn. – *Planta*, 125(2): 127–139.
- Oertel, W., T. Wichard & A. Weissgerber. 2015. Transformation of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) by vector plasmids integrating into the genome. – *Journal of Phycology*, 51(5): 963–979.
- Prince, E. K. & G. Pohnert. 2010. Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1): 193–197.
- Provasoli, L. 1958. Effect of plant hormones on *Ulva*. – *The Biological Bulletin*, 114(3): 375–384.
- Spoerner, M., T. Wichard, T. Bachhuber, J. Stratmann & W. Oertel. 2012. Growth and thallus morphogenesis of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) depends on a combination of two bacterial species excreting regulatory factors. – *Journal of Phycology*, 48(6): 1433–1447.
- Stratmann, J., G. Paputsoglu & W. Oertel. 1996. Differentiation of *Ulva mutabilis* (Chlorophyta) gametangia and gamete release are controlled by extracellular inhibitors. – *Journal of Phycology*, 32(6): 1009–1021.
- Vesty, E. F., R. W. Kessler, T. Wichard & J. C. Coates. 2015. Regulation of gametogenesis and zoosporogenesis in *Ulva linza* (Chlorophyta): comparison with *Ulva mutabilis* and potential for laboratory culture. – *Frontiers in Plant Science*, 6: 15; doi:10.3389/fpls.2015.00015.
- Wagner-Dobler, I., V. Thiel, L. Eberl, M. Allgaier, A. Bodor, S. Meyer, S. Ebner, A. Hennig, R. Pukall & S. Schulz. 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. – *ChemBioChem*, 6(12): 2195–2206.
- Wichard, T. 2015. Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). – *Frontiers in Plant Science*, 6: 86; doi:10.3389/fpls.2015.00086.
- Wichard, T. & W. Oertel. 2010. Gametogenesis and gamete release of *Ulva mutabilis* and *Ulva lactuca* (Chlorophyta): Regulatory effects and chemical characterization of the “swarming inhibitor”. – *Journal of Phycology*, 46(2): 248–259.
- Wichard, T., B. Charrier, F. Mineur, J. H. Bothwell, O. D. Clerck & J. C. Coates. 2015. The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. – *Frontiers in Plant Science*, 6: 72; doi:10.3389/fpls.2015.00072.

Diskussion

A. Bresinsky: Sie erwähnten im Zusammenhang mit der Bildung einer morphogenetisch wirksamen Substanz (Thallusin) die Grünalpengattung *Monostroma*. *Monostroma* ist nah verwandt mit der Gattung *Ulva*, sie unterscheidet sich von *Ulva* dadurch, dass sie eher einschichtig-fädige Thalli bildet anstatt großflächige wie *Ulva*. Da ist natürlich die Frage hochinteressant, ob bei *Monostroma* die Substanz ebenfalls mithilfe von Bakterien gebildet wird. Ich würde daher eine parallele Untersuchung mit der Gattung *Monostroma* empfehlen.

T. Wichard: Das Thallusin wurde tatsächlich ursprünglich aus Bakterien isoliert, die auf der Oberfläche von *Monostroma* wachsen und mit ihr assoziiert sind.² Daher ist es eher umgekehrt: Wir können jetzt bestätigen, dass das *Thallusin* auch bei *Ulva* wirkt, aber in einer ganz anderen Art und Weise. Bei *Monostroma* fördert es eher die Zellteilung des Blattes, also das, was in unserem System der *Roseobacter* übernimmt, während es bei *Ulva* eher die Rhizoidentwicklung und die Zellwandbildung fördert.

S. Renner: Wie weit verbreitet ist diese Assoziation zwischen einer Alge und ihren Bakterien?

T. Wichard: Im Rahmen eines EU-Projektes überprüfen wir gerade, wie weit dieses Phänomen, das wir bei *Ulva mutabilis* beschrieben haben, auch bei anderen *Ulva*-Arten verbreitet ist, die weltweit gesammelt werden. Das Schwierige dabei ist immer, dass man auch den Lebenszyklus dieser Algen verstanden haben muss. Sonst kann man nicht die Gametenbildung induzieren, um phototaktische Gameten zu erhalten, mit denen man am Ende die axenischen Kulturen herstellen kann. Wir versuchen gerade, die Lebenszyklen von *Ulva linza*, die zum Beispiel in Großbritannien vorkommt, und von *Ulva rigida*, einer weltweit verbreiteten Art, besser zu verstehen. Bei *Ulva linza* funktioniert das bereits sehr gut und wir

führen entsprechende Austauschexperimente durch, bei denen wir Bakterien, die von *Ulva linza* isoliert worden sind, in unserem *Ulva-mutabilis*-System testen und umgekehrt. Wir sehen dabei, dass es zwar im Feinen Unterschiede gibt, aber dass im Wesentlichen die Bakterien austauschbar sind. Zu beachten ist dabei, dass der »*Roseobacter*-Faktor« anscheinend von vielen sehr unterschiedlichen Bakterienarten produziert wird, während der »*Cytophaga*-Faktor« eher spezifisch für seine Gattung ist.

C. Müller: Wie kann man Thallusin in so einer geringen Konzentration in so einer komplexen Matrix wie dem Meerwasser finden?

T. Wichard: Normalerweise würde man das bakterielle Kulturmedium für eine Extraktion und Naturstoffaufklärung wählen und tatsächlich findet man die Aktivität auch in den Bakterienkulturüberständen. Allerdings wächst der *Cytophaga* sp. alleine leider nicht in einem Minimalmedium und ein Vollmedium ist für die Naturstoffextraktion aufgrund der vielen Begleitstoffe nicht geeignet. Deswegen sind wir zu dem natürlichen Seewassermedium zurückgekehrt, in dem *Ulva* wächst und in dem nur Spurenelemente und Vitamine vorhanden sind. Dann kann man tatsächlich eine Festphasenextraktion von 50 Litern Kulturen durchführen. Nach Größenausschlusschromatografie haben wir mittels LC-gekoppelter Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie Thallusin im Spurenbereich in der Aquakultur von *Ulva* gefunden. Bei allen Aufreinigungen gilt es zu beachten, dass co-aufgereinigte Substanzen toxisch für die axenischen Gameten im Biotest zur morphogenetischen Aktivität sein können. Eine biotestgeleitete Fraktionierung von Thallusin wäre dann nicht mehr möglich. Biotests sind aber wichtig, da die biologisch wirksame Konzentration weit unter der Nachweisgrenze selbst moderner Massenspektrometer liegt.

2 Matsuo, Y., H. Imagawa, M. Nishizawa & Y. Shizuri. 2005. Isolation of an alga morphogenesis inducer from a marine bacterium. – *Science*, 307 (5715): 1598.