

Praktikumsbericht

Forschungspraktikum
Am Max-Planck-Institut Golm für molekulare
Pflanzenphysiologie

Vom 13. 7, 2009 bis 8. 8. 2009

Inhaltsverzeichnis

3	Persönliche Vorstellung
4	Das Institut
5	Die Arbeitsgruppe
6	Zusammenfassung
8	Einführung
12	Material und Methoden
17	Versuchsergebnisse
20	Auswertung
23	Fazit
24	Literaturverzeichnis

Persönliche Vorstellung

Zurzeit gehe ich auf das St. Ursula Gymnasium in Dorsten, wo ich nach den Ferien die 12. Klasse besuchen werde. Auf dem Gebiet der Pflanzenphysiologie hatte ich bisher sehr wenige Erfahrungen, auch hatte ich in dieses Thema bisher eher wenig Interesse, weil ich mich damit kaum auseinandergesetzt habe.

Das Praktikum am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie wurde mir über die dritte Auswahlrunde der Internationalen Biologie Olympiade in Deutschland zuerkannt.

Während des Praktikums hat die Grundlagenforschung auf molekularer Ebene, die in diesem Institut betrieben wird, mein Interesse geweckt.

Das Institut

Das Institut, an dem ich mein Praktikum absolviert habe, ist das Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm. Es wurde am 1. Januar 1994 gegründet. Das Institut gliedert sich in drei Abteilungen, die nacheinander aufgebaut wurden. Geleitet werden sie von Prof. Lothar Willmitzer, Prof. Mark Stitt und Professor Ralph Bock. Innerhalb der Abteilungen leiten weitere Wissenschaftler eigene Arbeitsgruppen.

In diesem Institut wird hauptsächlich an der Gen-Funktionsbeziehung und dem pflanzlichen Stoffwechsel geforscht. Dazu gehören sowohl die Untersuchungen von einzelnen Zellen, Geweben und pflanzlichen Organen als auch Studien in Gewächshäusern und Freilandversuche mit transgenen Pflanzen, mit denen die im Gewächshaus gewonnenen Ergebnisse überprüft werden.

Die Arbeitsgruppe

Die Arbeitsgruppe, in der ich vier Wochen mitgearbeitet habe, gehört zu der von Prof. Dr. Ralph Bock geleiteten Abteilung für Organellenbiologie, Biotechnologie und Molekulare Ökophysiologie. Ich war in der Forschungsgruppe von Dr. van Dongen eingesetzt, die hauptsächlich in zwei Themenbereichen forscht. Der erste Forschungsschwerpunkt liegt auf der Regulation der Energieproduktion durch die mitochondriale Elektronentransportkette. Ein zweiter Schwerpunkt der Forschung liegt auf den Einflüssen von bakteriellen Endophyten auf den Stoffwechsel ihrer Wirtspflanzen. Bei diesem zweiten Schwerpunkt habe ich unter der Leitung von Dr. Jens Schwachtje und Ina Thormaehlen mitgearbeitet.



Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppe befasst sich mit der Wechselbeziehung zwischen Pflanzen und Bodenbakterien, von denen sehr viele in der Rhizosphäre leben. Im Laufe der Evolution hat sich zwischen einigen von ihnen und bestimmten Pflanzen eine Symbiose entwickelt. Dabei bekommen die Bakterien von der Pflanze einerseits physischen Schutz, aber sie erhalten auch Stoffe, die von der Pflanze als Sekundärstoffe über die Wurzel abgegeben werden und können diese beispielsweise als Kohlenstoffquellen nutzen. Aber auch die Pflanzen können von dieser Wechselbeziehung profitieren, da die Bakterien Eigenschaften entwickelt haben, die einen positiven Einfluss auf die Pflanze haben. Solche „plant growth promoting rhizobacteria“ können das Wachstum der Pflanze fördern oder ihr helfen, Pathogene abzuwehren. Ein Teil dieser Bakterien lebt endophytisch im Gewebe, andere auf der Wurzeloberfläche. Der größte Teil dieser Wechselbeziehungen ist noch unerforscht.

Um darüber neue Erkenntnisse zu gewinnen, haben wir den Einfluss zweier Bakterienstämme, einmal Stamm 62, ein *Pseudomonas*stamm, und Stamm 72, einem Mikrobakterienstamm, auf das Wachstum des *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col-0 (Columbia) untersucht.

Dazu haben wir die Samen von *Arabidopsis* mit den jeweiligen Bakterien inkubiert und dann wachsen lassen, wobei nach einiger Zeit auch ein positiver Effekt auf das Pflanzenwachstum zu erkennen war. Weiterhin haben wir herauszufinden versucht, wie genau diese Wechselbeziehung funktioniert. Es wurden dieselben Versuche zum Wachstum auch mit Pflanzen-Mutanten durchgeführt, denen bestimmte Gene zur Erkennung von pathogen-assoziierten Eigenschaften (PAMP, pathogen

associated molecular pattern) fehlen. Auch hier war dieselbe wachstumsfördernde Auswirkung der Bakterien zu erkennen, die allerdings noch stärker ausgeprägt war als beim Wildtyp.

Einführung

Im Laufe der Evolution haben sich Pflanzen und Mikroorganismen wechselseitig aneinander angepasst, wobei auf beide Gruppen ein Selektionsdruck ausgeübt wurde. Ein klassisches Beispiel sind die Anpassungsvorgänge zwischen Blüten von Samenpflanzen und ihren tierischen Bestäubern. Eine solche Anpassung zeigt auch das Beispiel der PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Unterschiedlichste Bodenbakterien und Pilze haben im Laufe der Koevolution eine symbiontische Beziehung mit den Wurzeln der Pflanzen gebildet. Von dieser Wechselbeziehung profitieren sowohl die Mikroorganismen als auch die Pflanzen. Dabei fördern die Bakterien das Wachstum der Pflanze und ihre Abwehr gegen Pathogene. Sie siedeln sich im Wurzelsystem der Pflanze an und beeinflussen diese direkt oder indirekt. Man kann bei den PGPR zwischen den extrazellulären PGPR (ePGPR) und den intrazellulären PGPR (iPGPR) unterscheiden. Die ePGPR existieren in der Rhizosphäre, d.h. auf den Wurzeln oder in den Räumen zwischen den Wurzelzellen des Kortex. Die iPGPR dagegen leben direkt in den Wurzelzellen und werden deshalb als Endophyten bezeichnet.¹ Das wohl bekannteste Beispiel für Endophyten stellen die N₂-fixierenden Rhizobakterien dar, die in spezialisierten knotenähnlichen Strukturen (Wurzelknöllchen) leben.

Bis jetzt wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, durch die PGPR das Pflanzenwachstum fördern können, diese sind entweder indirekt oder direkt. Zu den direkten Mechanismen gehört die Produktion von Pflanzenhormonen

wie Auxin, aber auch die Fixierung von atmosphärischem Stickstoff für die Pflanze oder die Produktion von eisenbindenden Molekülen, um Eisen an die Pflanzen weiterzugeben.² Außerdem machen manche Bakterien den Pflanzen andere Nährstoffe wie zum Beispiel Phosphatsalze zugänglich oder können Enzyme produzieren, die Einfluss auf Pflanzenhormone wie Ethylen haben, das normalerweise ein Inhibitor für die Wurzel- Elongation ist.³

PGPR können aber auch indirekt Einfluss auf das Wachstum der Pflanze nehmen, indem sie die Pflanze vor Pathogenen schützen. Das kann durch von dem Bakterium produzierte Antifungizide oder antibakterielle Peptide geschehen oder die so genannte „induced systemic resistance“ (ISR).⁴ Dabei sinkt die Krankheitsempfänglichkeit der Pflanze, da die Abwehrleistung gegen Pathogene erhöht wird. Da Pflanzenhormone wie Ethylen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen spielen, deren Produktion auch von PGPR beeinflusst wird, spielt dieser Mechanismus bei der ISR vermutlich eine Rolle.

Unbekannt ist größtenteils, wie es dazu kommt, dass bestimmte Bakterien von der Pflanze als nicht schädlich erkannt werden und daher nicht wie Pathogene abgewehrt werden.

Es ist allerdings bereits bekannt, dass höhere Pflanzen Substanzen produzieren und sekretieren können, was einen direkten Einfluss auf „Quorum sensing“ (QS) hat.⁵ Das hat einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie, die Entwicklung und das Verhalten von Bakterien. Es ermöglicht den Bakterien beispielsweise die Populationsdichte wahrzunehmen und gegebenenfalls ihre Gene so zu regulieren, dass es nicht zu einer „Überbevölkerung“ kommt.⁶

Man weiß auch, dass Pflanzen und Tiere in der Lage sind, mit bestimmten Rezeptoren Pathogene als solche zu erkennen. Diese so genannten „pattern recognition receptors“ (PRRs), zu denen auch die „toll-like receptors“ (TLR) gehören, erkennen kleine Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wie das Flagellinmolekül flg22 auf der Pathogenoberfläche. Wenn Pflanzen spezifische Muster an den Pathogenen erkennen, dann scheint es auch möglich, dass Pflanzen spezielle Muster auf PGPR wahrnehmen. Z. B. besitzen alle Pseudomonaden Flagellin, darunter gibt es Pathogene und PGPR.

Es wurden bereits schon einige Experimente bezüglich Pflanzen - Bakterien Interaktionen an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt.

Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), auch Schotenkresse genannt, ist eine relativ häufige Pflanzenart aus der Familie der Kreuzblütler. Sie ist eine unscheinbare, niedrige, einjährige, krautige Pflanze, die bis zu 30 cm hoch wird. Die Grundblätter sind rosettenartig und ihr Stängel rund. Die Grundblätter sind gezähnt, die Stängelblätter dagegen ganzrandig. Die Ackerschmalwand blüht weiß in ihrer Hauptblütezeit von April bis Mai. Ihre Blüten sind zwei bis vier Millimeter groß. Ihre Samen sind in Schotenfrüchten, die ein bis zwei Zentimeter lang werden, ihre Wurzeln gehen bis zu 40 cm in die Tiefe.⁷

Arabidopsis thaliana hat zwar keine Bedeutung für die Landwirtschaft, ist aber als Modellorganismus in der Genetik etabliert, da sie hierfür viele Vorteile hat. Außerdem ist sie eine nahe Verwandte des Kohls und seinen Zuchtformen. Sie hat ein relativ kleines Genom mit 125 mb, dessen Sequenz schon bekannt ist, und nur fünf Chromosomenpaare. Durch den kurzen Generationszyklus von acht Wochen kommt die Forschung schneller zu Ergebnissen und durch die vielen Samen pro Pflanze (bis zu

10000) hat sie eine hohe Reproduktionsrate. Da Arabidopsis sehr anspruchslos ist, ist sie einfach zu kultivieren. Weiterhin sind von ihr schon viele Mutanten bekannt, deren Samen auch einfach gelagert werden können.



Abb 2: Arabidopsis Thaliana (www.ec.europa.eu)

Material und Methoden

Bakterien

Ich habe mit zwei Bakterienstämmen gearbeitet, von denen schon bekannt war, dass sie PGPR von Arabidopsis sind. Das waren der Mikrobakterienstamm #72 und der Pseudomonasstamm #62A. Diese wurden auf TSA-Medium (tryptic soybean agar) ausgestrichen und bei 28° C im Dunkeln inkubiert, die Flüssigkulturen bei gleichen Bedingungen mit TSB (tryptic soybean bouillon) inkubiert.

Pflanzen

Für die Untersuchungen haben wir die Arabidopsis-Ökotypen Col-0 und Gol-1 verwendet und mehrere Mutanten, bei denen verschiedene Gene für die PAMP-Erkennung oder –Abwehr ausgeschaltet waren. Ich habe hauptsächlich mit der Mutante fls2, gearbeitet, bei der die Erkennung eines für bestimmte Pathogene typischen Flagellinmoleküls, das auch auf der Oberfläche von Bakterien aus dem Stamm #62A zu finden ist, ausgeschaltet ist. Die Samen für diese Pflanzen haben wir selbst von Pflanzen im Gewächshaus geerntet.

Vor der Verwendung wurden die Samen folgendermaßen sterilisiert:

Die Eppis, in denen die Samen liegen, werden zuerst mit 1ml Ethanol gefüllt, dazu wird ein Tropfen Tween20(eine Lauge) gegeben. Jetzt muss das gemischt werden und die Flüssigkeit 5 min auf die Samen einwirken. Nach dieser Zeit werden die Eppis kurz zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipetiert. Danach werden die Samen mit autoklavierten H₂O gewaschen, das heißt man gibt 1ml Wasser auf die Samen, schüttelt sie gut, zentrifugiert sie kurz und nimmt wieder den Überstand ab. Nach dem Waschen gibt man 1ml Hypochlorid zu den Samen und

wieder einen Tropfen Tween20, lässt das einwirken und pipettiert nach dem Zentrifugieren den Überstand ab. Zum Schluss müssen die Samen noch dreimal wie oben beschrieben gewaschen werden. Wenn die Samen direkt gebraucht werden, füllt man den Eppi noch einmal mit autolavierten H₂O auf, ansonsten werden sie auf Filterpapier getrocknet.

Für die einzelnen Versuche wurden die Samen entweder auf Agarplatten mit AMOZ Medium (Arabidopsis Medium Ohne Zucker) aufgebracht und in ein Phytotron (Wachstumskammer) gestellt oder im Gewächshaus in Töpfe mit Arabidopsis-Erde gepflanzt.

Keimungstests

Für die Keimungstests wurden die sterilisierten Samen auf quadratische Petrischalen aufgetragen, indem sie zuerst in autoklaviertes H₂O gegeben und dann einzeln mit der Pipette aufgetragen wurden. Auf eine Platte haben wir ca. 40 Samen von Col-0 und dem Golmer Ökotypen Gol-1 gelegt. Danach kamen die Platten in eine Wachstumskammer, wo sie bei 20°C und einem zwölfstündigen Tag wachsen konnten.

Am dritten Tag wurden die Keimungstests dann ausgewertet.

Vertikalplatten

Für diesen Ansatz haben wir bei quadratischen Agarplatten das obere Drittel des Mediums entfernt, sodass wir mit derselben Technik wie bei den Keimungstests auf die Schnittkante pro Platte zehn Samen aufbringen konnten. Wir haben jeweils acht Platten mit Col-0 Samen bestückt, die zuvor mit Bakterien vom Stamm #72 oder #62A inkubiert wurden, und weitere acht Platten mit unbehandelten Col-0 Samen als Kontrolle. Außerdem haben wir Samen der Arabidopsismutante fls2 genauso behandelt und jeweils vier Platten mit diesen Samen bestückt. Die fertigen Platten haben wir in Blöcken senkrecht in die Wachstumskammer gelegt. Dabei mussten wir aufpassen, dass wir die Reihenfolge der Platten täglich tauschten, da sonst durch den Blockeffekt, also die Tatsache, dass die Pflanzen so unterschiedlich viel Licht bekommen, Wachstumsunterschiede auftreten können.

Nach 10 Tagen wurden die Platten pikiert. Wir haben bei jeder Platte die Pflanzen so ausgezupft, dass bei jedem

Ansatz die Pflanzen in etwa gleich groß waren und keine zwei Pflanzen so nahe aneinander standen, dass sie sich gegenseitig beim Wachsen behindern könnten.

Nach 12 Tagen wurden die Platten eingescannt und als Bild gespeichert, sodass die Längen der Hauptwurzeln mit Hilfe des Programms Digimizer in Pixel gemessen werden konnten und diese bei Excel in die richtige Länge umgerechnet und ausgewertet werden konnte.

Nach weiteren 2 Tagen haben wir das Frischgewicht des Sprosses in Milligramm gewogen und auch mit einem Excelprogramm ausgewertet.

Microarrayansatz

Ziel dieses Ansatzes war es, herauszufinden, ob und wie sich die Inkubation mit Bakterien auf die Proteinproduktion auswirkt, was man über die RNA messen kann.

Dazu wurden zuerst Samen auf mit Erde gefüllte Eppis, bei denen zuvor die Spitze abgeschnitten wurde gelegt. Diese Eppis wiederum wurden in mit Erde gefüllte Weckgläser und diese in einen Phytotron gestellt. Hier sind sie 11 Tage gewachsen, bis sie dann so pikiert wurden, dass alle in etwa gleich groß waren. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die Pflanzen geerntet. Dazu wurden die Pflanzen so sortiert, dass wir neun Weckgläser erhalten haben, in denen immer gleich viele Pflanzen waren.

Bei jeweils dreien dieser Gläser wurden die Pflanzen mit $MgSO_4$ als Kontrolle oder den Bakterienstämmen #72 beziehungsweise #62A inkubiert, wobei die genaue Uhrzeit aufgeschrieben wurde, damit sie alle möglichst nach der gleichen Zeit geerntet werden konnten. Nach sechs Stunden mussten die Pflanzen dann geerntet werden. Dazu wurden

sie zunächst vorsichtig mit einem Spatel aus dem Epipi genommen, wobei sie nicht verletzt werden durften, da sonst RNAsen aktiv werden würden, die die RNA abbauen.

Danach wurden die Pflanzen von der restlichen Erde befreit, abgewaschen und schnell in flüssigen Stickstoff gelegt, damit der gesamte Stoffwechsel angehalten wird. Dabei musste darauf geachtet werden, dass jeweils die Pflanzen, die mit der gleichen Flüssigkeit inkubiert wurden, in ein Schälchen kamen.

Nach dieser Ernte wurden die Pflänzchen erst einmal eingefroren, bis die RNA extrahiert wurde.

Die Extraktion wurde mit dem RNeasy kit der Firma QUIAGEN durchgeführt.

Die RNA, die dabei extrahiert wurde, ist an die Firma QUIAGEN geschickt worden, wo sie dann genauer analysiert wurde.

Versuchsergebnisse

Keimungstests

Bei der Auswertung der Keimungstests kamen wir zu folgendem Ergebnis: Bei dem Arabidopsis Thaliana Ökotypen sind 23 von 40 Samen gekeimt, bei anderen Mutanten dagegen 0 von 40.

Vertikalplatten

Bei den Versuchen mit den Vertikalplatten zeigte sich am Frischgewicht des Sprosses, dass die Pflanzen des Wildtyps Col-0 ohne Bakterien viel schwerer waren als die Mutanten fls2.

Beim Wildtyp waren die vorher mit den Bakterienstämmen inokulierten Pflanzen schwerer als die Kontrollpflanzen, wobei nur der Gewichtsunterschied zu den mit Stamm #62 behandelten Pflanzen groß genug war, um statistisch relevant zu sein.

Auch bei den fls2-Mutanten waren die vorher mit Bakterien inokulierten Pflanzen schwerer als die Kontrollen, wobei hier die Unterschiede um einiges größer waren als beim Wildtyp und beide Unterschiede auch statistisch relevant waren. Im Gegensatz zum Wildtyp allerdings hatte hier der Bakterienstamm #72 eine größere Auswirkung auf das Gewicht der Pflanzen.

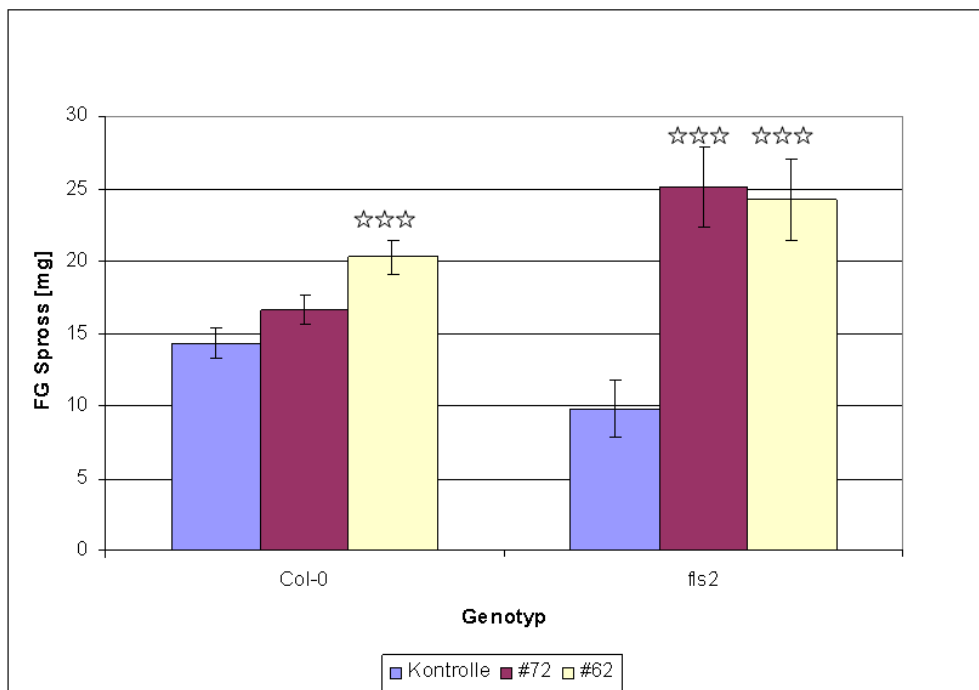


Abb.3: das Frischgewicht des Sprosses der Pflanzen aus den Vertikalplatten

Die Messung der Wurzellängen der Pflanzen aus demselben Ansatz wie oben dagegen ergab, dass die Wurzeln der mit Bakterien behandelten Pflanzen kürzer sind als die der Kontrollpflanzen.

Auch hier zeigten sich Unterschiede bei den Wurzellängen des Wildtyps und der fls2-Mutante, deren Wurzeln kürzer waren als die des Wildtyps. Die Bakterien wirkten sich auf beide Genotypen ähnlich stark aus, wobei sie ein weniger ausgeprägtes Wurzelwachstum hervorriefen. Dabei waren die durch den Bakterienstamm #72 hervorgerufenen Unterschiede weniger stark als die durch #62 bewirkten Unterschiede und auch nicht statistisch relevant. Die mit Stamm #62 inokulierten Pflanzen hatten viel kürzere

Wurzeln als ihre Kontrollen, wobei diese Unterschiede auch statistisch relevant waren.

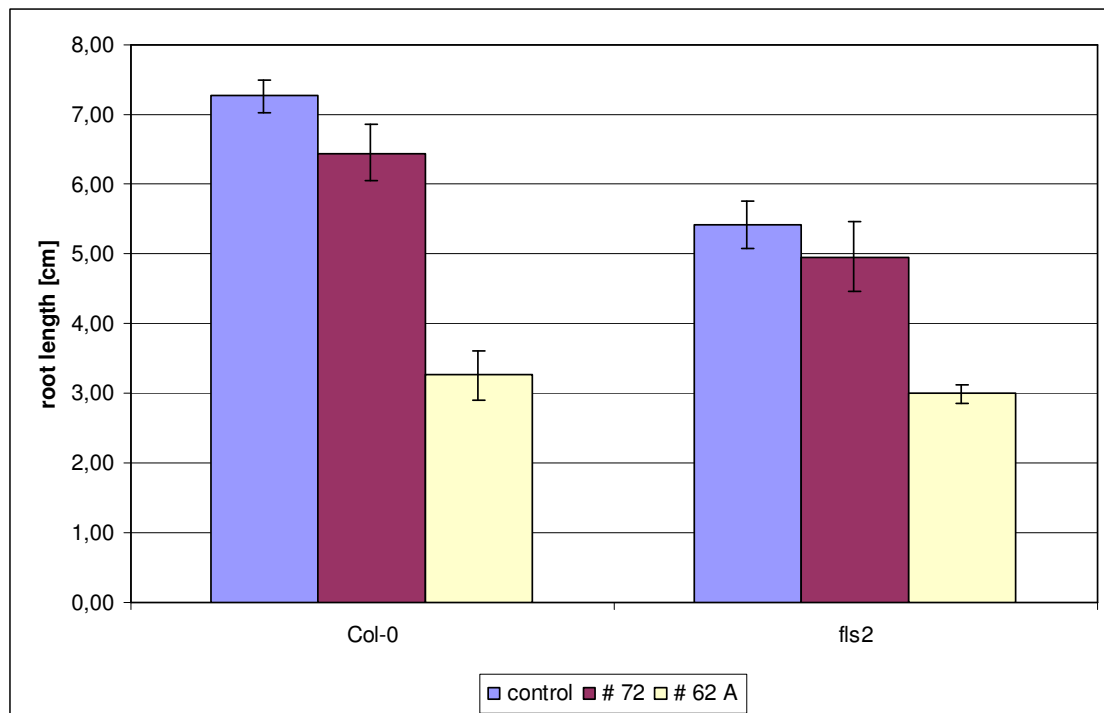


Abb. 3: die Wurzellängen der Pflanzen aus dem Ansatz mit den Vertikalplatten

Weiterhin war bei diesem Ansatz eine starke Kontamination der Vertikalplatten mit Pilzen und Bakterien zu erkennen.

Mikroarrayansatz

Zu dem Mikroarrayansatz lagen während meines Praktikums noch keine Ergebnisse vor, da die Proben zu der Firma QUIAGEN eingeschickt wurden, wo sie dann erst untersucht wurden.

Auswertung

Keimungstests

Dass bei den Mutanten keine der Samen gekeimt sind, lag vermutlich am dem Nährboden, auf dem wir die Samen gesetzt hatten. Dieser war vermutlich nicht in Ordnung.

Vertikalplatten

Frischgewicht des Sprosses

Die mit Bakterien behandelten Pflanzen sind deutlich schwerer als die Kontrollpflanzen. Dies zeigt, dass sich die Bakterien fördernd auf das Pflanzenwachstum auswirken. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Bakterien vom Stamm #62 beim Wildtyp eine stärkere Auswirkung haben als der Stamm #72.

Bei den *fls2* Mutanten ist ein bestimmtes Gen für die PAMP-Erkennung, das zur Erkennung des für einige Pathogene typischen Flagellinmoleküls dient, ausgeschaltet. Dieses Molekül ist auch auf der Oberfläche von Bakterien vom Stamm #62 zu finden. Bei diesen Mutanten ist der Einfluss von Stamm #62 viel stärker als auf den Wildtyp, was zeigt, dass die Pflanze das Bakterium besser annimmt und nicht abwehrt wie es wohl beim Wildtyp zunächst geschieht. Allerdings hat bei dieser Mutante der Stamm #72 eine größere Auswirkung als #62 und auch als Stamm #72 beim Wildtyp hat. Daher kann man annehmen, dass auch dieses Bakterium ohne das Flagellinerkennungsgen besser von der Pflanze angenommen wird.

Wurzellänge

Bei der Wurzellänge zeigt sich ein genau umgekehrtes Ergebnis: Die Zugabe von Bakterien bewirkt kürzeres Wurzelwachstum als es bei den Kontrollen ist. Allerdings wurde hier nur die Länge der Hauptwurzel gemessen, daher wurden die Nebenwurzeln nicht beachtet, die bei den mit Bakterien inkubierten Pflanzen durchaus zahlreicher und größer sein könnten. Weiterhin könnte hier auch die starke Kontamination der Platten mit verschiedenen anderen Bakterien und Pilzen eine Rolle gespielt haben, sodass sie das Pflanzenwachstum vielleicht negativ beeinflusst haben, indem weniger Nährstoffe für die verschiedenen Pflanzen vorhanden waren, oder sich auch positiv ausgewirkt haben, indem sie zum Beispiel Kohlenstoffdioxid produziert haben, das die Pflanzen nutzen konnten.

Fazit

Bei dem Praktikum am Max-Planck-Institut in Golm habe ich insgesamt sehr viele gute neue Erfahrungen gemacht. Vor allem das praktische Arbeiten im Labor hat mir sehr viel Spaß gemacht. Dabei habe ich neue Arbeitsmethoden kennen gelernt. Weiterhin hat es sehr viel Spaß gemacht zu sehen, wie richtige Forscher arbeiten und selbst mit zu arbeiten. Auch war es interessant zu sehen, welche Möglichkeiten die Forscher in so einem großen Institut haben.

Die Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe, in der ich mitarbeiten durfte, waren sehr freundlich und haben mich gut betreut, sodass ich immer alles fragen konnte und mich bei Problemen an sie wenden konnte. Weiterhin wurde ich so in die Gruppe integriert, als wäre ich nicht nur eine Praktikantin gewesen.

Bedanken möchte ich mich daher bei denjenigen, die dieses Praktikum möglich gemacht haben, beim MPI und der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. van Dongen, die mich mitarbeiten haben lassen, bei meinen Betreuern Herr Griebner vom Förderverein der Biologieolympiade und Dr. Schwachtje, dem Betreuer im Institut und bei der Robert-Bosch-Stiftung, die das Praktikum gesponsert haben.

Literaturverzeichnis

¹ Gray, Smith (2004)

² Mercado-Blanco, Bakker (2007)

³ Glick et al. (1997)

⁴ Van Peer et al. (1991)

⁵ Tepitski et al. (2000); Gao et al. (2003); Bauer, Mathesius (2004)

⁶ Mercado-Blanco, Bakker (2007)

⁷ wikipedia.org/wiki/Acker-Schmalwand/