

Prüfung von Resistenz und umweltrelevanten Auswirkungen beim Freilandanbau transgener T4-Lysozymkartoffeln

Johann de Vries¹, Andreas Mahn^{2*}, Klaus Düring^{2*}, Inge Broer³, Jana Lottmann⁴, Gabriele Berg⁴, Holger Heuer⁵, Kornelia Smalla⁵, Ingrid Ahrenholtz¹ und Wilfried Wackernagel¹

¹ Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg, Genetik, Fachbereich Biologie, Postfach 2503, 26111 Oldenburg

² Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Züchtungsmethodik bei Gemüse, Neuer Weg 22/23, 06484 Quedlinburg*

³ Universität Rostock, Fachbereich Biologie, Zellphysiologie, Doberaner Str. 143, 18051 Rostock

⁴ Universität Rostock, Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie, Gertrudenstraße 11a, 18051 Rostock

⁵ Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

Zusammenfassung

Die Freisetzungsversuche von T4-Lysozym-produzierenden Kartoffeln (erhöhte Resistenz gegen *Erwinia carotovora* als Erreger der Schwarzbeinigkeit und Knollennassfäule) an zwei Standorten wurden von einem komplexen Forschungsprogramm über bisher zwei Vegetationsperioden begleitet. Dabei wurde eine Reihe neuer Untersuchungsmethoden entwickelt und am Freisetzungsversuch validiert. Mit diesen wurden die Eigenschaften der Kartoffeln charakterisiert, die Aktivität und Wirkung des T4-Lysozyms in den Pflanzen und die Abgabe aus den Wurzeln verfolgt, die Auswirkung auf nützliche und schädliche Bodenbakterien quantifiziert und schließlich die Einflüsse auf die Gemeinschaft der Rhizosphären-Bakterien bestimmt. Die bisherigen Untersuchungen zeigten stabile Freilandexpression des T4-Lysozym-Gens und erhöhte Resistenz von Pflanzen und Knollen. Obwohl das T4-Lysozym in geringem Umfang aus den Wurzeln abgegeben wird und im Laborversuch bakterizid auf die meisten der untersuchten nützlichen und schädlichen Bodenbakterien wirkt, ließen sich bislang im Freiland bei Anwendung sehr empfindlicher Prüfmethode keine negativen Auswirkungen auf die Nützlinge und die Gemeinschaften der Rhizosphären-Bakterien nachweisen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die T4-Lysozym-Produktion durch transgene Pflanzen als eine wirksame, ökologisch sichere Methode der biologischen Bekämpfung bakterieller Pflanzenschädlinge erweist.

* Neue Adresse: MPB Cologne GmbH, Neurather Ring 1, 51063 Köln

Abstract

The field release of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes (increased resistance against *Erwinia carotovora* causing black leg and soft rot) at two locations has been combined with a complex research project during a two-year period. Several novel methods have been established and validated on field plants and their rhizospheres in order to characterise the resistance properties of the potatoes, to measure the lysozyme activity in the potatoes and its release from the plants, to quantify the influence of T4 lysozyme on plant growth promoting, antagonistic, and pathogenic soil bacteria, and to determine influences on the bacterial community of the rhizosphere. The studies indicate stable expression of the T4 lysozyme gene and increased resistance of plants and tubers. Although small amounts of T4 lysozyme are released from the roots and the enzyme killed most of the tested soil bacteria in the test tube, in the field so far no negative effects were found by using highly sensitive methods on plant growth promoting and antagonistic bacteria and the rhizosphere community. The results suggest that transgenic plants producing T4 lysozyme will provide an efficient and ecologically safe biological control of phytopathogenic microorganisms.

Einleitung

Das Gram-negative Bakterium *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* verursacht weltweit erhebliche Ernteverluste bei Kartoffeln infolge Befall der Pflanzen (Schadbild: Schwarzbeinigkeit) und der Knollen (Schadbild: Knollennassfäule), letzteres insbesondere während der Lagerung (Perombelon und Kelman, 1980). Eine Bekämpfung des Schädling im Freiland ist bisher nicht möglich. Die Expression des T4-Lysozym-Gens in gentechnisch veränderten Kartoffeln der Sorte Désirée, gesteuert vom CaMV 35S-Promotor und kombiniert mit der Translokation des Lysozyms in den Apoplast aufgrund der Fusion mit einem Signalpeptid, hat den Pflanzen in Labor- und Gewächshausuntersuchungen eine erhöhte Resistenz gegen *E. carotovora* ssp. *atroseptica* verliehen (Düring et al., 1993). Hierbei wurde die natürliche antibakterielle Wirkung eines Enzyms aus der Gruppe der Lysozyme (zellwandauflösende Aktivität für Gram-negative und Gram-positive Bakterien; in den Organismenreichen weit verbreitet) eingesetzt. Im vorliegenden Verbundprojekt wurden in umfangreichen Studien jeweils die Ausgangslinie Désirée mit einer transgenen Linie ohne Lysozym-Gen (DC1) und mit transgenen Linien mit T4-Lysozym-Gen (DL4, DL5; später wurden die weiteren Linien DL10 bis DL12 hinzugenommen) verglichen.

In Laborexperimenten und in freisetzungsbegleitender Sicherheitsforschung ging es um eine Reihe zentraler Fragen. Kann die erhöhte Schädlingsresistenz auch im Freilandanbau festgestellt werden? Wie verläuft die Expression des Transgens im Freiland und an verschiedenen Standorten? Enthalten die Pflanzen tatsächlich aktives T4-Lysozym? Gelangt dies aus den Pflanzen in die Umwelt (Rhizosphäre)? Ist das Enzym im Freiland aktiv? Kann das Enzym sich tötend oder wuchsbehindernd auf andere Bodenbakterien auswirken? Wird rekombinante DNA in den Boden abgegeben? Lässt sich ein negativer Einfluss

von T4-Lysozym auf ein mit Pflanzen in Symbiose lebendes Modell-Bakterium (*Rhizobium leguminosarum*) nachweisen? Wirkt sich der Anbau T4-Lysozym-produzierender Pflanzen nachteilig auf die für Pflanzen nützlichen Bakterien aus? Wird evtl. ein Einfluss von den T4-Lysozym-Pflanzen auf die Gemeinschaft der Rhizosphären-Bakterien erkennbar, der möglicherweise zu Langzeitveränderungen der Bodenmikrobengemeinschaft führt?

Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen wurde von den folgenden fünf Arbeitsgruppen in einem eng verzahnten Forschungsverbund angegangen:

1. Arbeitsgruppe Priv.-Doz. Dr. Klaus Düring (Quedlinburg; neue Adresse: MPB Cologne GmbH, Neurather Ring 1, 51063 Köln)
Schwerpunkte: Freisetzung, Resistenz- und Expressionsstudien
2. Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wilfried Wackernagel (Oldenburg)
Schwerpunkte: Lysozym-Aktivität in und außerhalb der Pflanzen, Lysozym-Empfindlichkeit von Bakterien, Ausstreuung rekombinanter DNA
3. Arbeitsgruppe Priv.-Doz. Dr. Inge Broer (Rostock)
Schwerpunkte: Auswirkung von Lysozym auf Rhizobien und deren Nodulationsfähigkeit
4. Arbeitsgruppe Dr. Gabriele Berg (Rostock)
Schwerpunkt: Einfluss auf kartoffelassoziierte nützliche Bakterien
5. Arbeitsgruppe Priv.-Doz. Dr. Kornelia Smalla (Braunschweig)
Schwerpunkt: Effekte auf bakterielle Gemeinschaften der Rhizosphäre.

Die bisher erhaltenen wichtigsten Ergebnisse werden in diesem Übersichtsartikel kurz zusammengefasst.

Ergebnisse

Freilandanbau und Transgen-Expression

Der Freilandanbau umfasste neben der Ausgangslinie (Désirée) und der Kartoffellinie DC1 (ohne T4-Lysozym-Gen) zwei Linien mit T4-Lysozym-Gen (DL4 und DL5), und zwar an Standorten in Groß Lüsewitz und Quedlinburg. Dabei zeigte sich, dass DL4 einen deutlich abweichenden Phänotyp (geringere Wuchshöhe, verzögerter Entwicklungsablauf, reduzierte Wurzel-Biomasse) aufwies, vermutlich als Folge somaklonaler Variation. Dies führte zu dem erst kürzlich begonnenen Einsatz von weiteren Linien (DL10 bis DL12) für Freisetzungen (2000 und 2001). Insgesamt erwies sich, dass mit Knollen aus Freilandanbau ein besserer Feldwuchs und damit eine wichtige Voraussetzung für eine Bonitur (einschließlich Resistenzprüfung) und für die Untersuchungen der Begleitforschung erreicht wurde. Die Überprüfung der Transgen-Expression im Freiland erfolgte mittels Western blot-Analyse von Pflanzenextrakten (Densitometer-Auswertung). Dabei wurde eine relativ konstante Expression ermittelt (max. 0,0014% des Gesamtproteins als T4-Lysozym; Düring und Mahn, 1999). Diese war am Standort Quedlinburg in 3 Anbaujahren höher als in Groß Lüsewitz (durchschnittlich um den Faktor 1,3).

Resistenz von Pflanzen und Knollen

Der Infektionsdruck von *E. carotovora* spp. *atroseptica* ist im Freiland in unseren Regionen nicht sehr groß. Deshalb wurden die Knollen vor der Pflanzung zusätzlich inokuliert, und zwar mit Hilfe der Vakuuminfiltration bzw. der mechanischen Schraubenerkrankung (pathogene Stämme Nr. 549 und 1710 NCPPB, Harpenden, UK). Zusätzlich wurde das Erntegut mit verschiedenen Methoden auf Resistenz und Lagerungsfähigkeit überprüft.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen. Gegenüber den Vergleichspflanzen Désirée und DC1 ist DL5 im Feld bezüglich ihrer Anfälligkeit für Schwarzbeinigkeit deutlich im Vorteil. Auch bei den Nacherntetests erwiesen sich Knollen von DL4 und DL5 als resistenter. Tab. 1 gibt die Ergebnisse eines Halbknollentests (Düring und Mahn, 1999) wieder, bei dem der Mazerationsbereich am Infektionsort bei den Lysozymproduzierenden Linien weniger als halb so groß war wie bei den Kontrollknollen. Für Linie DL5 ließ sich das auch 1998 reproduzieren. Damit werden Ergebnisse aus Voruntersuchungen in Labor und Gewächshaus im Freiland bestätigt. Es wurde also anhand der Freilandversuche erstmalig ein praxisrelevanter Vorteil der T4-Lysozym-Linien aufgezeigt, insbesondere von DL5.

Linie	durchschnittliches Volumen des mazerierten Gewebes	Signifikanzgruppe ($\alpha = 0,05$)
Désirée	0,83 ml	B
DC1	1,31 ml	C
DL4	0,34 ml	A
DL5	0,33 ml	A

Tab. 1: Erhöhte Resistenz der Knollen der T4-Lysozym-produzierenden Linien DL4 und DL5 gegen *E. carotovora* ssp. *atroseptica* im Halbknollentest, verglichen mit der Ausgangs- (Désirée) und Kontroll-Linie (DC1)

Erhöhte Lysozym-Aktivität in den Knollen

Die Expressionsmessungen des T4-Lysozym-Gens waren mit Blattextrakten durchgeführt worden, in denen antigenes Material mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen T4-Lysozym (Hexa-His-markiertes Protein aus *Escherichia coli*; Düring et al., 1993) quantifiziert wurde (Western blot-Analyse). Enthielten auch die Knollen T4-Lysozym und ist dies *in planta* aktiv? Für die erforderlichen Aktivitätsmessungen wurden ein spezifisches Verfahren zur Gewinnung und partiellen Reinigung von Knollenpress-Säften entwickelt sowie ein hochempfindlicher Lysozym-Test ausgearbeitet. Dieser beruhte auf der Extinktionsabnahme einer spätlogarithmischen Zellsuspension von *Bacillus subtilis* in Gegenwart von T4-Lysozym, gemessen im Zweistrahlphotometer (de Vries et al., 1999a). Die Abb. 1 zeigt, dass geringe natürliche Lysozym-Aktivität in ähnlicher Höhe in Knollen von Désirée und DC1 auftritt, jedoch in DL4 und DL5 Knollen signifikant höhere bakterioly-

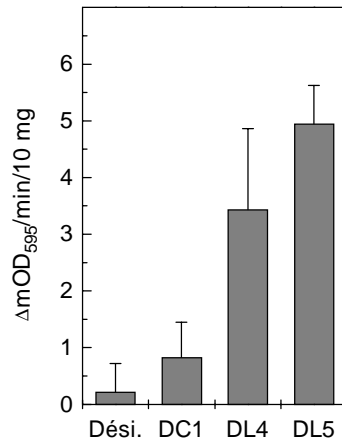


Abb. 1: Spezifische lytische Aktivität in partiell gereinigten Knollenpress-Säften von Linien ohne (Désirée, DC1) und mit T4-Lysozym-Ggen (DL4, DL5), bezogen auf lösliches Protein (Einzelheiten s. Text).

tische Aktivität vorliegt. Diese Befunde legen nahe, dass das chimäre T4-Lysozym in den Kartoffeln aktiv und ursächlich für die erhöhte Resistenz gegen *E. carotovora* ist.

Entlassung von aktivem Lysozym aus der Pflanze

Die Anwesenheit des Transitpeptids am N-Terminus des T4-Lysozyms erlaubt die Sekretion aus der Zelle in den Apoplast, wo die infizierenden pathogenen Bakterien in der Pflanze abgetötet werden sollen (Düring *et al.*, 1993). Die mögliche weitergehende Abgabe von Lysozym aus der Wurzel in die Umwelt wurde auf zwei verschiedene Arten überprüft. Einerseits wurden Kartoffelpflanzen in Hydrokultur (unsteril) angezogen und die Kulturflüssigkeit der Wurzeln über mehrere Tage gesammelt, konzentriert und einer Western blot-Analyse unterzogen. Eine T4-Lysozym-Bande trat nicht bei den Kontrollen (Désirée, DC1), jedoch bei DL4 auf (de Vries *et al.*, 1999a). Ein Test auf die bakterizide Aktivität des Lysozyms in der Wuchslösung war jedoch nicht möglich (de Vries *et al.*, 1999a).

Ein zweiter Test bestand in dem direkten Nachweis der Tötung von Bakterien auf den Oberflächen von Wurzeln der T4-Lysozym-produzierenden Pflanze. Die *in situ*-Tötungswirkung wurde mit einem im Projekt neu entwickelten Verfahren bestimmt. Zellen von *B. subtilis* wurden unter Verwendung von Bindungsvermittlern an die Wurzeln adsorbiert (Ahrenholtz *et al.*, eingereicht) und nach einiger Zeit ihr Überleben an Ort und Stelle im Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Dabei kamen die Farbstoffe Syto 9 (grün; lebende Zellen) und Propidiumjodid (rot; tote Zellen) zum Einsatz (Ahrenholtz *et al.*, eingereicht). Anhand von Gewächshauspflanzen (Standorterde) wurde gefunden, dass bereits die Wurzeln der Ausgangs- und Kontroll-Linien eine deutliche bakterizide Wirkung entfalten. Die Wurzeln von T4-Lysozym-produzierenden Pflanzen waren aber immer um einen Faktor von 1,5 bis 3,5 signifikant höher in ihrer Tötungswirkung (Abb. 2). Damit ist bewiesen,

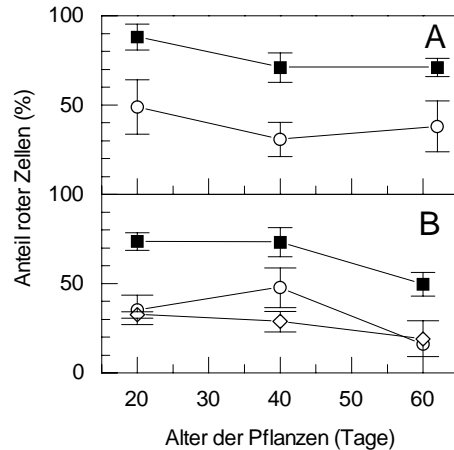


Abb. 2: Tötung von *B. subtilis* 168-Zellen auf den Wurzeloberflächen von Gewächshaus-Kartoffelpflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach deren Aussaat. Die Analyse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Einzelheiten siehe Text). Die Knollen wurden zu verschiedenen Zeiten ausgesät (A, B) und stammten von den Linien Désirée (○; nicht-transgen), DC1 (◇; transgen ohne T4-Lysozym-Gen), und DL10 (■; transgen mit T4-Lysozym-Gen).

dass Lysozym im Feuchtfilm auf der Wurzeloberfläche auftritt und so direkt in die Rhizosphäre gelangen kann.

Umfangreiche Überlebensmessungen mit zahlreichen Bodenbakterien einschließlich diverser pflanzenpathogener Organismen (inkl. sieben *E. carotovora*-Stämme) zeigten, dass die meisten ohne Anwendung von EDTA empfindlich gegen T4-Lysozym sind (Tab. 2). Andere Untersuchungen hatten ergeben, dass T4-Lysozym einen großen Teil seiner bakteriziden Wirkung auch in wässrigen Extrakten verschiedener Böden entfaltet (de Vries *et al.*, 1999b).

Die Rhizosphären transgener Pflanzen enthalten rekombinante DNA

Die gesamte extrazelluläre DNA kann aus einem Boden mit einer speziellen Elutionstechnik (Blum *et al.*, 1997) isoliert werden. Damit wurde die relativ lange Überdauerung von DNA trotz Anwesenheit von DNasen erwiesen. Mit Hilfe eines neuen Verfahrens, mit dem durch paramagnetische Sonden bestimmte DNA aus dem Boden herausgeholt werden kann, wurde rekombinante DNA mit T4-Lysozym-Gen in 98 von 116 untersuchten Rhizosphäre-Extrakten transgener Pflanzen identifiziert (84,5%). In Extrakten von Kontrollpflanzen (Désirée und DC1) wurde nur in Einzelfällen (3,4%) rekombinante DNA gefunden (de Vries *et al.*, 1999b). Dies könnte auf Verschleppungen von Boden- und Pflanzenmaterial aus den transgenen Aufwuchsflächen beruhen (Wackernagel *et al.*, 1999).

Es war ein Biomonitoring-Verfahren für das Transformationspotential rekombinanter DNA für kompetente Bakterien entwickelt worden. Dieses zeigte, dass das Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*), das heute in einem Großteil transgener Pflanzen vorliegt, aus transgenen Kartoffeln, Zuckerrüben, Raps, Tabak und Tomate als freie DNA auf *Acinetobacter*

spec. BD4 übertragbar ist (de Vries und Wackernagel, 1998). Mit einer Weiterentwicklung des Verfahrens kann nun spezifisch die rekombinante DNA der Kartoffel in der Rhizosphäre ermittelt werden. Erste Ergebnisse belegen, dass dort tatsächlich rekombinante DNA der transgenen Kartoffel vorliegt, die in der Lage ist, die im Monitoring eingesetzten natürlich kompetenten *Acinetobacter*-Bakterien genetisch zu transformieren.

Bakterienstamm	Lysozym	Überleben (%)	Gram	Kommentar
Alle Stämme (Referenzwert)	–	100	–	
<i>Escherichia coli</i> AB1157	+	1,5	–	Laborstamm
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300	+	1,7	–	
<i>Acinetobacter</i> spec. BD4	+	38	–	
<i>Bacillus subtilis</i> 168	+	≤0,002	+	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> V.h. 5e	+	5,9	–	Pflanzennützlich
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 101	+	27	–	Pflanzenpathogen
<i>Ralstonia solanacearum</i> 325	+	81	–	Pflanzenpathogen
<i>Ralstonia solanacearum</i> 790	+	87	–	Pflanzenpathogen
<i>Ralstonia solanacearum</i> 909	+	84	–	Pflanzenpathogen
<i>Ralstonia solanacearum</i> 1579	+	32	–	Pflanzenpathogen
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i> B56	+	0,008	–	Pflanzenpathogen
<i>Clavibacter michiganense</i> ssp. <i>insidiosum</i>	+	3,4	+	Pflanzenpathogen
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>sepedonicum</i>	+	0,068	+	Pflanzenpathogen
<i>C. michiganense</i> ssp. <i>michiganense</i>	+	0,0010	+	Pflanzenpathogen
<i>Erwinia amylovora</i>	+	42	–	Pflanzenpathogen
<i>Erwinia carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> 549	+	14	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> 1708	+	15	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> 1710	+	12	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>atroseptica</i> 2232	+	1,0	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> 434	+	13	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> 1311	+	8,1	–	Pflanzenpathogen
<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> 1312	+	4,9	–	Pflanzenpathogen

Tab. 2: Überleben von verschiedenen Bodenbakterien (und *Escherichia coli*) nach Behandlung mit T4-Lysozym (10 µg/ml; 60 min bei 25°C); Daten sind Mittelwerte aus drei bis sechs unabhängigen Messungen (de Vries *et al.*, 1999a)

T4-Lysozym-Empfindlichkeit von *Rhizobium leguminosarum*

Rhizobien sind bedeutende Nützlinge in der Landwirtschaft wegen ihrer Fähigkeit zur Stickstoff-Fixierung bei Symbiose mit Nutzpflanzen. Sie wurden in diesem Projekt als Modellorganismen für die T4-Lysozym-Wirkung eingesetzt. Versuche hatten gezeigt, dass diese Bakterien *in vitro* nur eine mittlere Anfälligkeit gegen Lysozym aufweisen (Tab. 2). In Wachstumsversuchen in Gegenwart von T4-Lysozym zeigten die Bakterien aber selbst bei sehr geringen Enzym-Konzentrationen drastische Beeinträchtigung (Tab. 3), die durch EDTA noch gesteigert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass kurzfristige Einwirkung und langdauernde Anwesenheit von T4-Lysozym im Lebensraum der Bakterien eine separate Bewertung hinsichtlich der bakterienschädigenden Wirkung erfordern. Demnach können die in einem Test scheinbar unwirksamen, niedrigen Konzentrationen dann doch langfristig negative Auswirkung auf Bodenbakterien haben (Broer *et al.*, 1999).

Versuch	T4-Lysozym ($\mu\text{g/ml}$)	EDTA (1 mM)	Titer relativ zu dem am Versuchsbeginn
1	–	–	7
2	0,3	–	2
3	3,0	–	1,5
4	10,0	–	0,1
5	–	–	60
6	–	+	20
7	3	–	2,3
8	3	+	0,3

Tab. 3: Wachstumsbehinderung von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in Vollmedium durch die Anwesenheit von T4-Lysozym (Zeitpunkt 22,5 h nach Beimpfung)

T4-Lysozym behindert die Nodulation durch Rhizobien

Die Wachstumsförderung bei Pflanzen durch Rhizobien erfordert erfolgreiche Knollenbildung (Nodulation). Mit Hilfe eines Nodulationstests (Kriete und Broer, 1996) wurde gefunden, dass eine Behandlung von *R. leguminosarum* mit T4-Lysozym ihre Nodulationsfähigkeit für *Vicia hirsuta* signifikant verringert (Tab. 4), vor allem bei niedrigen Inokulationstitern. Während ein Eintauchen von Wurzeln in Lysozym-Lösung die Nodulation nicht messbar verringerte, stellte die T4-Lysozym-Produktion in den Wurzeln selbst eine deutliche Behinderung der Nodulation dar. Dies wurde anhand eigens erstellter transgener *V. hirsuta*-Wurzeln ermittelt. Diese enthielten verschiedene rekombinante Konstrukte mit dem T4-Lysozym-Gen nach dem CaMV 35S-Promotor oder dem knöllchenspezifischen *V. faba glb3*-Promotor (Küster *et al.*, 1995) und besaßen das Lysozymgen mit und ohne Signalpeptid für Sekretion aus den Zellen. Es wurden pro Konstrukt 200 bis 250 Wurzeln untersucht, die jede für sich ein unabhängiges Transformationsereignis darstellte. In allen Fällen wurde eine um etwa 50% verringerte Nodulation gegenüber den transgenen Wurzeln ohne T4-Lysozym-Gen gefunden (Broer *et al.*, 1999).

Inokulat-Titer	Anzahl Knöllchen/Wurzel	
	- T4-Lysozym	+ T4-Lysozym
$2,5 \times 10^2$	7,6 ($\pm 1,0$)	4,4 ($\pm 0,3$)
$1,0 \times 10^3$	5,6 ($\pm 0,5$)	3,6 ($\pm 0,3$)
$1,0 \times 10^5$	3,2 ($\pm 0,9$)	2,1 ($\pm 0,2$)

Tab. 4: Verringerung der Nodulation durch *Rhizobium leguminosarum* von *Vicia hirsuta* als Folge einer Vorbehandlung der Bakterien mit T4-Lysozym, die nicht das Bakterienüberleben verminderte

Diese Behinderung der Nodulation beruht vermutlich auf der bakteriziden Wirkung von T4-Lysozym in der Wurzel oder ihrer Oberfläche. Gleichzeitig war die Wuchs- und Nodulationsbehinderung durch freies T4-Lysozym gefunden worden (Tab. 3 und 4). Darum wurden ausgiebige Pflanzungsversuche durchgeführt, bei denen *V. hirsuta* direkt neben und zwischen den T4-Lysozym-Kartoffeln im Freiland aufwachsen und deren natürliche Nodulation bzw. Acetylen-Reduktion (als Maß für die Stickstoff-Fixierung) zu verschiedenen Zeiten quantifiziert wurde. Dabei wurden zwar standortspezifische und jahreszeitliche Differenzen der Nodulation und Stickstoff-Fixierung von *V. hirsuta* in der Nachbarschaft von verschiedenen Kartoffellinien (einschließlich Désirée und DC1) ermittelt, aber eine negative Auswirkung der T4-Lysozym-Produktion war bislang nicht festzustellen (Broer *et al.*, 1999).

Auswirkung auf nützliche Bakterien: Antagonisten

T4-Lysozym wirkt nicht spezifisch gegen pathogene Bakterien (Tab. 2). Deshalb kann eine erwünschte Wirkung gegen Schädlinge durch eine gleichzeitige negative Auswirkung auf pflanzenassoziierte Nützlinge wieder aufgehoben werden. Darüber hinaus kann eine Verdrängung von Nützlingen langfristig zu einer landwirtschaftlich und ökologisch nachteiligen Verschiebung der Mikrobengemeinschaft des Bodens führen. Um hier zu bewertbaren Daten zu gelangen, wurde der Anteil an Antagonisten an der kultivierbaren Fraktion der Rhizosphäre- und Geocaulosphäre- (Knollenoberfläche) Bakterien aus dem Freiland ermittelt sowie die Zusammensetzung (Artenspektrum) bei den einzelnen Kartoffellinien abgeschätzt. Als Antagonisten wurden sowohl Bakterien mit Wirkung gegen *Erwinia carotovora* als auch mit antifungischer Wirkung (gegen *Verticillium dahliae*) gewertet. Insgesamt wurden in zwei Freisetzungsperioden 3.648 Isolate untersucht. Der Anteil antifungischer Isolate lag bei 1 bis 13,5%, signifikante Unterschiede zwischen den vier Kartoffellinien und auch zwischen den Probenahmezeitpunkten ergaben sich nicht (Lottmann *et al.*, 1999). Es wurde bei 150 näher charakterisierten Isolaten von Antagonisten ein weites Spektrum von insgesamt 34 Arten gefunden (mit Hilfe von API-, BIOLOG- und FAME-Analysen ermittelt), das sich relativ gleichmäßig auf die Linien verteilte (Tab. 5).

Nr.	Spezies	Anzahl antagonistischer Isolate			
		Désirée	DC1	DL4	DL5
1	<i>Actinobacillus lignieresii</i>		1		
2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1		1	1
3	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1			
4	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>				1
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		1		
6	<i>Bacillus cereus</i>			1	
7	<i>Bacillus megaterium</i>		1		
8	<i>Bacillus mycoides</i>			1	
9	<i>Bacillus thuringiensis</i>			1	
10	<i>Burkholderia cepacia</i>	1			
11	<i>Comamonas acidovorans</i>	1	2	1	1
12	<i>Enterobacter intermedius</i>			1	
13	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	1			
14	<i>Francisella philomiragia</i>		1		
15	<i>Paenibacillus macerans</i>				1
16	<i>Paenibacillus polymyxa</i>		1		
17	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	3	4	4
18	<i>Proteus vulgaris</i>			1	
19	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	6	6	2	4
20	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1	1		1
21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8	6	4	4
22	<i>Pseudomonas faecalis</i>				1
23	<i>Pseudomonas marginalis</i>	2	4	1	
24	<i>Pseudomonas putida</i>	6	13	5	12
25	<i>Pseudomonas savastoni</i>			1	1
26	<i>Pseudomonas syringae</i>	2	3	1	1
27	<i>Pseudomonas vesicularis</i>			2	
28	<i>Serratia grimesii</i>	3	2		
29	<i>Serratia liquefaciens</i>	1			
30	<i>Serratia plymuthica</i>		1		1
31	<i>Serratia proteamaculans</i>				1
32	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		1		
33	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2		2	2
34	<i>Streptoverticillium reticulum</i>			1	
Anzahl der Spezies		15	16	16	15

Tab. 5: Anzahl der Isolate verschiedener Bakterienspezies aus Rhizo- und Geocaulosphäre der Kartoffellinien Désirée, DC1, DL4 und DL5, zusammengefasst von den Standorten Groß Lüsewitz und Quedlinburg

Auswirkung auf nützliche Bakterien: PGPR (plant growth promoting rhizobacteria)

Eine wichtige Gruppe der pflanzenassoziierten Nützlinge sind die wachstumsfördernden Bakterien, zu denen die Produzenten von Indol-3-Essigsäure (IES), einem wichtigen Wuchshormon für Pflanzen gehören. Aus den Rhizosphären isolierte Bakterien mit IES-Bildung ($\geq 1,5\mu\text{g/ml}$; Lottmann *et al.*, 1999) schwankten zahlenmäßig zwischen den einzelnen Probenahmen (1996 bis 1997), waren aber nicht signifikant unterschiedlich verteilt auf Pflanzen mit und ohne T4-Lysozym-Produktion (Tab. 6).

Probenahme	Anzahl Isolate			
	Désirée	DC1	DL4	DL5
1.	35	34	27	29
2.	14	19	14	8
3.	22	25	20	24
4.	19	29	21	33
5.	42	34	42	33
6.	68	64	64	64
Summe	200	205	191	191

Tab. 6: Isolate aus der Rhizosphäre der Versuchspflanzen im Freilandanbau mit Indol-3-Essigsäurebildung aus den Jahren 1996 und 1997 (Lottmann und Berg, 1999)

Zusammen mit den Ergebnissen des vorigen Abschnitts ergibt sich, dass die Erfassung der nützlichen Bakterien aus dem Lebensraum der Kartoffel durch Charakterisierung von Einzelisolaten hinreichend informativ und empfindlich ist, um z.B. Standortunterschiede zu identifizieren. Hinweise auf signifikante Unterschiede hinsichtlich Abundanz und Spektrum der Nützlinge bei T4-Lysozym-produzierenden und Kontrollpflanzen ergaben sich nach Auswertung zweier Vegetationsperioden nicht (Lottmann *et al.*, 1999).

Überlebens- und Besiedlungsfähigkeit ausgewählter Antagonisten an T4-Lysozym-Kartoffeln

Für diesen 1998 durchgeführten Freilandversuch wurden zwei Bakterienisolate ausgewählt. Es handelte sich zum einen um einen *Pseudomonas putida*-Stamm, der von der Oberfläche einer DL5-Knolle isoliert worden war und IES produziert. Vertreter dieser Spezies waren in den Rhizosphären aller Kartoffellinien gefunden worden. Zum anderen wurde ein *Serratia grimesii*-Isolat ausgewählt (IES-Produzent und Antagonist gegen *Verticillium dahliae*). Vertreter dieser Spezies konnten nicht aus den Rhizosphären von T4-Lysozym-Kartoffeln isoliert werden, sondern wurden nur an Kontrollpflanzen gefunden. Von beiden Isolaten wurden Rifampicin-resistente Spontanmutanten hergestellt. Die Pflanzenknollen der Linien Désirée, DC1 und DL5 wurden mit der jeweiligen Bakterien-suspension inokuliert und anschließend ausgepflanzt. Reisolierung der beiden Isolate von den Freilandpflanzen zeigte, dass beide Stämme in der Lage waren, die Rhizo- und Geo-

caulosphäre transgener und nicht-transgener Kartoffeln gleichermaßen gut zu kolonisieren.

Analyse der Rhizosphäre-Gemeinschaften

Neben möglichen Auswirkungen auf Nützlinge wurde ein besonderes Augenmerk auf die Gesamtgemeinschaft der Rhizosphäre-Bakterien gerichtet. Dazu wurde von Freilandpflanzen Gesamt-DNA der Bakterien aus der Rhizosphäre einer detaillierten Analyse durch denaturierende Gradientengelelektrophorese von PCR-Amplifikaten aus der 16S-rDNA (PCR-DGGE) unterzogen (Heuer und Smalla, 1997a). Bei diesem Verfahren wurden kultivierbare und nicht-kultivierbare Bakterien berücksichtigt. Die erhaltenen Profile (Fingerabdrücke) unterschieden sich bei jungen, blühenden und seneszenten Pflanzen, vor allem aber auch zwischen den Standorten in Quedlinburg und Groß Lüsewitz. Diese Variationen waren stets größer als die zwischen T4-Lysozym-produzierenden und den Kontrollpflanzen. Im Stadium der beginnenden Seneszenz zeigte DL4 an einem Standort ein abweichendes Muster, das mit neu entwickelten Methoden charakterisiert wurde (Heuer *et al.*, 1999). Der Einsatz gruppenspezifischer Primer in der PCR-DGGE für α - und β -Proteobacteria sowie Actinomycetales, der die Sensitivität für Veränderungen der untersuchten Gruppe wesentlich erhöht (Heuer *et al.*, 1997), ergab keine Hinweise auf einen Einfluss von T4-Lysozym. Insgesamt ergaben die Profile, dass die Rhizosphäre-Gemeinschaft offenbar ein relativ konstantes Grundmuster zeigt. Dies ließ die große Zahl von Banden vermuten, die unabhängig von verschiedenen Einflüssen vorhanden war und allenfalls in ihrer Intensität variierte.

Katabolische Profile der Gemeinschaften und Artenverteilung der kultivierbaren Bakterien

Um mögliche Veränderungen der Bakteriengemeinschaften der Rhizosphäre zu erfassen, die mit funktionellen Eigenschaften der Rhizobakterien verknüpft sind, wurde von Proben der Gemeinschaften ein katabolisches Profil ermittelt (Glimm *et al.*, 1997). Der Vergleich der Verwertungsraten der im BIOLOG-System vorliegenden 95 Kohlenstoffquellen erwies sich als empfindlich (Heuer und Smalla, 1997b), erfasst jedoch nur einen Teil der Bakteriengemeinschaft (Smalla *et al.*, 1998). Signifikante Unterschiede wurden nur zwischen der T4-Lysozym-produzierenden Linie DL4 und der Ausgangslinie Désirée bzw. der Kontrolle DC1 erhalten, DL5 zeigte dagegen keine Abweichung gegenüber den Vergleichslinien. Diese Sonderstellung von DL4 wurde auch beobachtet, wenn die Diversität der Rhizosphäre-Gemeinschaft anhand von Einzelisolaten ermittelt wurde. Die Isolate wurden anhand ihres Fettsäuremusters bzw. teilweise durch die partielle Sequenzierung der 16S-rDNA charakterisiert. Dabei wurde eine große Diversität an Arten gefunden. Die häufigeren Arten waren in der Rhizosphäre aller Linien in etwa gleichen Mengen präsent. In der DL4-Rhizosphäre wurde im Seneszenz-Stadium an einem Standort eine verringerte Diversität gegenüber allen anderen Linien gefunden bei gleichzeitig signifikant höherer Lebendkeimzahl (Smalla und Heuer, 1999). Dies ist wahrscheinlich auf die schon oben erwähnte somaklonale Variation dieser Linie zurückzuführen. Damit ist anhand der Er-

gebnisse mit DL4 gezeigt, dass die verwendeten Methoden Unterschiede in der Rhizosphäre-Gemeinschaft detektieren können. Ein besonderer Einfluss von T4-Lysozym-produzierenden Pflanzen gegenüber den Vergleichslinien, der abgesichert signifikant wäre, wurde aber nicht gefunden (Smalla und Heuer, 1999). Wie schon in der Rhizosphäre, so wurde auch in den Blättern ein hohes Maß der Übereinstimmung zwischen den Bakteriengemeinschaften der T4-Lysozym-Pflanzen und der Kontrollen mit den beschriebenen Methoden gezeigt (Heuer und Smalla, 1999).

Schlussfolgerungen

Die konstitutive Expression des T4-Lysozym-Gens in Kartoffeln verleiht den Pflanzen auch im Freilandanbau eine erhöhte Resistenz gegen den Schaderreger *E. carotovora* ssp. *atroseptica* und führt zu geringerer Infektion der Knollen während Lagerungsexperimenten. Diese Effekte beruhen wahrscheinlich auf dem erhöhten Aktivitätsspiegel an Lysozym in den transgenen Pflanzen. Erhöhte lytische Aktivität tritt auch im Feuchtigkeitsfilm auf den Oberflächen von Wurzeln auf, die aus der Erde isoliert wurden. Deshalb ist mit einer Abgabe von T4-Lysozym in die Rhizosphäre zu rechnen. Rekombinante DNA wurde dort ebenfalls nachgewiesen. Bodenbakterien, darunter neben pathogenen auch zahlreiche nützliche, zeigten sich überwiegend sensibel gegen T4-Lysozym. Dies galt auch für Stickstoff-fixierende Rhizobien, bei denen die Überlebenden geschwächt in ihrem Nodulationsvermögen waren. Während diese Befunde auf mögliche negative Auswirkungen der T4-Lysozym-produzierenden Pflanzen auf die Bodenmikrobiota deuteten, konnten detaillierte Untersuchungen an Bakterien aus der Rhizosphäre dafür keine Hinweise liefern. Sowohl die Menge als auch das Artenspektrum pflanzenassoziiertes nützlicher Bakterien war bei den T4-Lysozym-Kartoffeln nicht vermindert. Auch das Profil der Gesamtbakteriengemeinschaft und ihr Muster der C-Quellenverwertung war nicht signifikant beeinflusst. Einige der Befunde bedürfen der Bestätigung durch weitere Freisetzungsexperimente und mit anderen T4-Lysozym-produzierenden Linien. Insgesamt können aber die bisherigen Forschungsergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit des Konzeptes einer biologischen Schädlingsbekämpfung durch pflanzliche T4-Lysozym-Produktion auch mit Blick auf die Verträglichkeit für das Ökosystem Boden als sehr positiv bewertet werden.

Danksagung

Die Arbeiten wurden dankenswerterweise durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung unterstützt, betreut durch BEO, Jülich.

Literatur

Ahrenholtz, I., Harms, K., de Vries, J., Wackernagel, W.:

Increased killing of *Bacillus subtilis* cells on roots of transgenic T4 lysozyme producing potatoes. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Blum, S.A.E., Lorenz, M. G., Wackernagel, W.:

Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in non-sterile soil. *System. Appl. Microbiol.* 20, 513-521, 1997.

Broer, I., Finke, M., Kriete, G., Küster, H., Quandt, H.-J., Wedell, S.:

Analyse der Auswirkungen von transgenkodiertem T4-Lysozym auf den Modellorganismus *Rhizobium leguminosarum*. In: J. Schiemann (Hrsg.): *Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Workshop*, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 59-70, 1999.

de Vries, J., Harms, K., Broer, I., Kriete, G., Mahn, A., Düring, K., Wackernagel, W.:

The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 22, 280-286, 1999a.

de Vries, J., Harms, K., Wackernagel, W.:

Untersuchungen zur Entlassung von T4-Lysozym und rekombinanter DNA aus transgenen, T4-Lysozym-produzierenden Kartoffeln. In: J. Schiemann (Hrsg.): *Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Workshop*, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 45-57, 1999b.

de Vries, J., Wackernagel, W.:

Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* 257, 606-613, 1998.

Düring, K., Mahn, A.:

Freisetzung und Resistenzprüfung transgener Lysozym-Kartoffeln. In: J. Schiemann (Hrsg.): *Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Workshop*, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 39-44, 1999.

Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., Lörz, H.:

Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.* 3, 587-598, 1993.

Glimm, E., Heuer, H., Engelen, B., Smalla, K., Backhaus, H.:

Statistical comparisons of community catabolic profiles. *J. Microbiol. Methods* 30, 71-80, 1997.

Heuer, H., Smalla, K.:

Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: Modern Soil Microbiology (J.D. van Elsas, E.M.H. Wellington, J.T. Trevors, Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York, 353-373, 1997a.

Heuer, H., Smalla, K.:

Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. J. Microbiol. Methods 30, 49-61, 1997b.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E.M.H.:

Analysis of actinomycete communities by specific amplification of 16S rDNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3233-3241, 1997.

Heuer, H., Smalla, K.:

Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme producing variants. FEMS Microbiol. Ecol. 28, 357-371, 1999.

Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., Smalla, K.:

Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1045-1049, 1999.

Kriete, G., Broer, I.:

Influence of the herbicide phosphinothricin on growth and nodulation capacity of *Rhizobium meliloti*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 580-586, 1996.

Küster, H., Quandt, H.-J., Broer, I., Perlick, A. M., Pühler, A.:

The promoter of the *Vicia faba* L. VfENOD-GPR3 gene encoding a glycine rich early nodulin consists of two functional parts mediating a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* nodules. Plant Mol. Biol. 29, 759-772, 1995.

Lottmann, J., Berg, G.:

Analyse der Auswirkungen von transgenkodiertem T4-Lysozym auf die kartoffelassoziierten nützlichen Bakterien. In: J. Schiemann (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 71-80, 1999.

Lottmann, J., Heuer, H., Smalla, K., Berg, G.:

Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 365-377, 1999.

Perombelon, M. C. M., Kelman, A.:

Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 361-387, 1980.

Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.-T., Forney, L.:

Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1220-1225, 1998.

Smalla, K., Heuer, H.:

Effekte transgener T4-Lysozym produzierender Kartoffellinien auf Bakteriengemeinschaften der Rhizosphäre im Freilandversuch. In: J. Schiemann (Hrsg.): *Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Workshop*, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projektträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 81-90, 1999.

Wackernagel, W., Blum, S., Meier, P.:

DNA-Entlassung aus transgenen Zuckerrüben während der Vegetations- und Überwinterungsphase und horizontaler Gentransfer im Boden. In: J. Schiemann (Hrsg.): *Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Workshop*, Braunschweig 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Braunschweig, Jülich, BEO (Projektträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 111-120, 1999.