

Auswirkung transgener Kartoffeln mit veränderter Stärkezusammensetzung auf die strukturelle und funktionelle Diversität von Bodenmikroorganismen

Michael Schloter¹, Sabine Lehmann², Laszlo Zelles¹, Margit von Lützow¹, Jean Charles Munch¹ und Kornelia Smalla²

¹ GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit,
Institut für Bodenökologie,
Ingolstädter Landstr. 1, 85758 Oberschleißheim

² Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit,
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

Zusammenfassung

In einem Begleitforschungsprojekt zur Freisetzung transgener Kartoffeln mit einer veränderten Stärkezusammensetzung wird die Auswirkung auf die Struktur und Funktion der Boden- und Rhizosphäre-Mikroorganismen untersucht. Die Beschreibung der mikrobiellen Diversität erfolgt in einem hierarchischen Ansatz, wobei sowohl mikrobielle Biomassen, Domänen und Superfamilien, Speziesverteilung und funktionelle Einheiten charakterisiert werden. Im ersten Jahr der Freisetzung wurde auf keiner der Skalen ein signifikanter Einfluss der transgenen Kartoffellinie auf die Zusammensetzung der dominanten Rhizosphäre- und Bodenmikroflora an den jeweiligen Standorten gefunden.

Abstract

In a risk assessment study related to the release of transgenic potatoes which are modified in their starch composition, the effects on the structure and function of the soil and rhizosphere microflora are studied. The characterisation of the microbial diversity is carried out in a hierarchical approach, where microbial biomass, domains and superfamilies, species and functional groups are described. In the first year of the release no significant influence of the transgenic potatoes was found.

Einleitung

Die Leistungen von Mikroorganismen sind eine unverzichtbare Grundlage für funktionierende Stoffkreisläufe in Agrarökosystemen. Standorte mit hoher Biodiversität zeichnen sich durch eine gute Pufferwirkung und Elastizität aus. Nach Einwirkung äußerer Ereignisse auf das Ökosystem können Populationen mit hoher Diversität auf Änderungen reagieren und das System im Gleichgewicht halten. Dagegen reagieren Systeme mit geringer Diversität und hochadaptierten Mikroorganismenformen kaum auf Änderungen. Daher sind Untersuchungen über die Diversität von Struktur und Funktion der mikrobiellen Le-

bensgemeinschaft unabdingbar, um Effekte bei der Änderung von Bewirtschaftungsformen sowohl im Hinblick auf Produktivität als auch auf Nachhaltigkeit verstehen und bewerten zu können. Darüber hinaus wird durch eine hohe mikrobielle Biodiversität das Vorhandensein eines möglichst breiten Spektrums von symbiontischen und assoziierten pflanzenwachstumsfördernden Mikroorganismen sowie Antagonisten zu pathogenen Organismen gewährleistet. Ergebnisse solcher Untersuchungen können sowohl Pflanzenzüchtern als auch Landwirten mehr Möglichkeiten einräumen, einen hohen Ertrag zu sichern und gleichzeitig Ressourcen und die Umwelt zu schonen. Zum Verständnis der mikrobiellen Diversität ist ein multifaktorieller Ansatz notwendig, der einerseits Prozessabläufe im Boden und andererseits mikrobielle Diversität sowie Änderungen innerhalb funktioneller Gruppen berücksichtigt.

Die Produktion einer reinen Amylopektin-Stärke in Kartoffelknollen ist ein wichtiges züchterisches Ziel im „non-food“-Bereich. Die Vorteile einer Amylopektin-Stärke gegenüber dem Gemisch mit Amylose liegen im höheren Molekulargewicht, der größeren Oberflächenreaktivität bei der Interaktion mit anderen Polymeren und der größeren Stabilität bei hohen Temperaturen. Stärke wird heute im technischen Bereich vorwiegend bei der Papierherstellung und in der Textilindustrie eingesetzt. Daher wurden Kartoffellinien mit dem „waxy“-Phänotyp auf gentechnischem Weg erzeugt. Dies könnte ein wichtiger Schritt zur Produktion nachwachsender Rohstoffe mit gesteigerter Qualität sein.

Im Zusammenhang mit diesen Aspekten ist das Ziel dieses Versuches die Beantwortung folgender Fragen:

- Wird durch die Freisetzung der transgenen Kartoffellinie, die eine veränderte Stärkeproduktion aufweist, im Vergleich zur Wildtypsorte die Mikroflora der Rhizosphäre in ihrer Zusammensetzung beeinflusst?
- Hat eine veränderte Zusammensetzung der Mikroflora unmittelbaren Einfluss auf die Funktion der Mikroorganismen in der Rhizosphäre?
- Ändert sich durch die Freisetzung das Verhalten gegenüber Parasiten, Symbionten oder Nahrungskonkurrenten innerhalb der autochthonen Mikroflora?
- Sind im Hinblick auf nachhaltige Beeinflussung der Bodenfunktionen als Stofftransformator (Mineralisierung, Humifizierung), Pflanzenstandort (Strukturabbau des Bodenkörpers bzw. Stabilität, Nährstoffnachlieferungspotential) und Umweltkompartiment Effekte zu erwarten?

Die Bearbeitung des vorliegenden Projekts erfolgt in Zusammenarbeit zwischen der GSF und der BBA. Um die genannten Hypothesen überprüfen zu können, wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

GSF: Durchführung des Freilandversuchs und Probenahme,
 Struktur der pilzlichen Boden- und Rhizosphäre-Mikroflora,
 Untersuchung pilztypischer Funktionen bei der Transformation von organischen Substanzen bzw. Nährstoffen,

BBA: Struktur der bakteriellen Boden- und Rhizosphäre-Mikroflora, Untersuchung bakterientypischer Funktionen bei der Transformation von organischen Nährstoffverbindungen.

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich Ergebnisse des ersten Freisetzungsjahrs vorliegen, werden im folgenden insbesondere das experimentelle Herangehen und erste, vorläufige Ergebnisse des Verbundprojekts dargestellt. Eine abschließende Bewertung ist erst nach Abschluss des Verbundvorhabens im Jahr 2001 möglich.

Experimentelles Herangehen und Ergebnisse

Felddesign und Probenahme

Um den Einfluss stärkernodifizierter Kartoffeln auf oben genannte Parameter zu analysieren, wurde ein Feldversuch in einer randomisierten Anlage mit achtfacher Wiederholung von Brache, Wildtyp Sorte SIBU und transgener Linie SIBU S1 über zwei Vegetationsperioden durchgeführt. Zu drei Probenahmezeitpunkten während der Vegetationsperiode wurden der nichtdurchwurzelte Boden („bulk soil“) und die Rhizosphäre beprobt. Die Analyse der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und möglicher Verschiebungen ihrer funktionellen Leistungen wurde von den Verbundpartnern mit dem gleichen Probenmaterial durchgeführt.

Kultivierungsunabhängige Verfahren

Da nur ein geringer Anteil der Bakterien und wahrscheinlich auch der Pilze aus dem Boden bzw. der Rhizosphäre mit traditionellen Kultivierungsverfahren erfasst werden kann, wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, die Aussagen über die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ohne vorherige Kultivierung ermöglichen.

Biomasse und Phospholipid-Extraktion

Da das Vorkommen charakteristischer (Marker-) Phospholipide für bestimmte Mikroorganismen typisch ist, kann durch die Zusammensetzung der Phospholipid-Fettsäuren direkt auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ohne Kultivierungsverfahren geschlossen werden. Vor allem im Bereich der höher integrierenden taxonomischen Ordnungen ist das Konzept der Marker-Phospholipide unumstritten. Die Extraktion der Phospholipid-Fettsäuren wurde nach Zelles *et al.* (1992) durchgeführt. Die quantitative Messung einzelner Phospholipide erfolgte mittels gekoppelter GC/MS-Analytik. Die Daten wurden mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Die mikrobielle Biomasse wurde durch Bestimmung des Gesamtgehalts an Phospholipid-Fettsäuren ermittelt. Die bislang vorliegenden Ergebnisse zur Biomassebestimmung zeigten 1998 einen typischen, jahreszeitlich geprägten Verlauf mit einer deutlichen Abnahme der Biomasse im Herbst. Ein Einfluss der transgenen Kartoffellinie auf die mikrobielle Biomasse wurde zu keinem Zeitpunkt festgestellt.

Ebenso wurde im ersten Jahr der Freisetzung zu keinem der Probenahmezeitpunkte ein signifikanter Einfluss der transgenen Kartoffellinie auf die Zusammensetzung der Bodenmikroflora (Großgruppen) mit Hilfe der Phospholipid-Fettsäureanalyse festgestellt. Es zeigte sich, dass die Gesamtfläche vor dem Auslegen der Kartoffelknollen im Mai 1998 homogen war. Im jahreszeitlichen Verlauf zeigte sich auf allen Flächen eine signifikante Verschiebung der Mikroorganismen-Populationen verglichen mit dem Ausgangszustand. Die fortschreitende Sukzession führte vor allem zwischen der ersten und der zweiten Probenahme zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Mikroflora. Zu den späteren Probenahmezeitpunkten waren die sukzessionsbedingten Änderungen weniger deutlich. Eine klare Unterscheidung zwischen den Bracheflächen und den Flächen mit Kartoffelpflanzen war nur zum zweiten Probenahmezeitpunkt (Beginn des Längenwachstums) möglich. Diese Ergebnisse, die schon in anderen Arbeiten beschrieben wurden (Zelles *et al.*, 1995), bestätigen den geringen Einfluss von Kartoffelpflanzen auf die Bodenmikroflora außerhalb des wurzelbeeinflussten Raums. Die Zusammensetzung der Phospholipid-Fettsäuren in den Rhizosphäre-Proben dagegen unterschied sich signifikant von den untersuchten Bodenproben (Rhizosphäre-Mikroflora). Allerdings wurde auch hier kein Einfluss der transgenen Linie beobachtet.

Direkte DNA-Extraktion und Analyse PCR-amplifizierter Fragmente

Für die kultivierungsunabhängige Analyse der Bakteriengemeinschaft wurde die DNA aus der von den Wurzeln bzw. von Bodenpartikeln gewonnenen Bakterienfraktion nach einer harschen Lyse isoliert und gereinigt (Van Elsas und Smalla, 1995). Für die Analyse der pilzlichen Gemeinschaft wurde die DNA direkt aus dem Boden bzw. von der Wurzel extrahiert. Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft erfolgt durch PCR-Amplifikation von 16S bzw. 18S rDNA-Fragmenten aus der Gesamt-DNA und ihre Auftrennung mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (D/TGGE). Bei Verwendung von bakterien- bzw. pilzspezifischen Primern können so Fingerprints der am häufigsten vorkommenden Populationen erhalten werden. Um eine Analyse weniger abundanter Bakteriengemeinschaften zu ermöglichen, werden gruppenspezifische Primer (α - und β -Proteobakterien und *high-G+C*-Grampositive) eingesetzt (α -, β -Primer unveröffentlicht; Heuer *et al.*, 1997). Die D/TGGE-Analyse der Bakteriengemeinschaft für das erste Versuchsjahr ergab, dass die Fingerprints sowohl der Boden- als auch der Rhizosphäre-Proben eine dominante Hauptbande und eine stärkere Nebenbande über die gesamte Vegetationsperiode aufwies. Die D/TGGE-Fingerprints zeigten aufgrund der Dominanz der zwei Hauptbanden nur geringe Unterschiede. Die Intensität der dominanten Hauptbande wurde im Verlauf der Vegetationsperiode schwächer. Die dominanten Banden wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Nach Sequenzierung und Auswertung der Sequenz wurde als nächster Verwandter der Hauptbande zu 99,28% ein *Sphingomonas* sp. bzw. *yanoikuyai* (α -Proteobakterium) und als der nächste Verwandte der Nebenbande zu 97,12% ein *Arthrobacter ramo* (*high G+C*) identifiziert. Obwohl bei der Anwendung gruppenspezifischer Primer deutlich komplexere Muster beobachtet wurden, zeigten die bisherigen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen der Wildsorte und der transgenen Kartoffel-

fellinie. Die DGGE-Analyse der Pilzgemeinschaften für das erste Versuchsjahr zeigte zu allen Probenahmezeitpunkten ein relativ konstantes Bandenmuster mit ebenfalls einer dominierenden Hauptbande. Eine Sequenzierung und phylogenetische Einordnung steht noch aus.

Kultivierungsabhängige Verfahren

Zur Untersuchung der kultivierbaren Fraktion der Bakterien wurden serielle Verdünnungen auf R2A-Medium plattiert, während die Kultivierung der Pilze auf einem Malzmedium erfolgte. Nach mehrtägiger Inkubation wurden die Zahl der koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt und dominante Bakterien- bzw. Pilzisolat gewonnen, deren Charakterisierung mit Hilfe der Fettsäureanalyse bzw. der Sequenzierung der 16S/18S-rDNA derzeit durchgeführt wird.

In der kultivierungsabhängigen Analyse der Bakterienpopulationen ergaben sich für den Boden im Jahresmittel Keimzahlen zwischen 10^6 und 10^7 CFU/g Boden, unabhängig davon, ob der Boden brach lag oder bepflanzt wurde. Für die Rhizosphäre konnten Keimzahlen von 10^8 CFU/g Wurzel über das Jahr hinweg ermittelt werden. Die Pilzkeimzahlen lagen im Jahresdurchschnitt bei 10^5 CFU/g Boden und bei 10^4 CFU/g Wurzel.

Die Kollektion dominanter Bakterienisolate wird benötigt, um über Polynukleotid-Sonden (sog. V6-Sonden) eine Zuordnung differenzierender Banden der D/TGGE-Fingerprints zu Isolaten zu ermöglichen (Heuer *et al.*, 1999).

Analyse des katabolischen Potentials der mikrobiellen Gemeinschaft als funktionelle Einheit

Die von der Rhizosphäre und dem Boden gewonnene mikrobielle Fraktion wurde in serieller Verdünnung in Mikrotiterplatten mit den Substraten Cellulose, Xylan, Chitin, Stärke und Casein pipettiert, um den Abbau hochmolekularer Stoffe zu verfolgen. Nach fünf Tagen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die MPN (most probable number) bestimmt und Proben aus der letzten Reihe vollständig bewachsener Kavitäten vereint, pelletiert und die Gesamt-DNA aus diesem Pellet nach Van Elsas und Smalla (1995) extrahiert. Nach PCR-Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente können mit Hilfe der D/TGGE Verschiebungen dominanter Bakterienpopulationen, die möglicherweise am Umsatz der hochmolekularen Substrate beteiligt sind, detektiert werden (Smalla *et al.*, 1998).

Schlussfolgerungen

Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigen sich im ersten Versuchsjahr keine Auswirkungen der Freisetzung einer transgenen Kartoffellinie mit veränderter Stärkezusammensetzung. Allerdings könnten der extrem trockene Sommer im ersten Versuchsjahr und die dadurch resultierende verminderte Aktivität der Mikroflora eventuell Einflüsse der transgenen Kartoffellinie auf die Boden- und Rhizosphäre-Mikroorganismenpopulationen überlagert haben. Ein nachhaltiger Einfluss auf die strukturelle Diversität erscheint dennoch unwahrscheinlich, da nach "guter landwirtschaftlicher Praxis" Kartoffelmonokulturen un-

gewöhnlich wären und eine 6-jährige Rotation der Flächen übliche landwirtschaftliche Praxis ist. Die Frage nach dem Einfluss der transgenen Kartoffellinie auf bakterielle und pilzliche Populationen lässt sich jedoch erst nach Vorliegen und Auswertung der Ergebnisse aus mehreren Versuchsjahren beantworten.

Danksagung

Wir danken der Planta Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, insbesondere Frau Dr. Anja Matzk, und Herrn Dr. Karsten Buhr für die Überlassung der transgenen Kartoffellinie und die Hilfe bei praktischen Fragen. Wir danken ebenso Familie Meidel für die fachgerechte Bewirtschaftung der Versuchsflächen.

Literatur

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

Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 23, 3233-3241, 1997.

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.

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.

Van Elsas, J.D., Smalla, K.:

Extraction of microbial community DNA from soils. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Hrsg.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic, Dordrecht, NL, 1.3.3.: 1-11, 1995.

Zelles, L., Bai, Q., Beck, T., Beese, F.:

Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure. *Soil Biol. Biochem.* 24, 317-323, 1992.

Zelles, L., Rackwitz, R., Bai, Q., Beck, T., Beese, F.:

Fractionation of fatty acids derived from soil lipids and their quantitative analysis by GC-MS. In: Collins, H.P., Klug, M. (Hrsg.) *The significance and regulation of soil biodiversity*. Kluwer Academic Publ., 115-122, 1995.