

## **Erzeugung transgener Gehölze und Sicherheitsforschung unter besonderer Berücksichtigung der bakteriellen Endophyten**

### **Molecular breeding of transgenic woody plants and risk assessment research taking endophytic bacteria into special consideration**

Kristina Ulrich<sup>1</sup>, Regina Becker<sup>2</sup>, Andreas Ulrich<sup>2</sup> und Dietrich Ewald<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Eberswalder Chaussee 3a, 15377 Waldsiedersdorf

<sup>2</sup> Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF) e.V., Institut für Landschaftsstoffdynamik, Eberswalder Str. 84, 15374 Müncheberg

Korrespondierender Autor:

Dietrich Ewald, Tel.: 033433/157-170, E-Mail: ewald@holz.uni-hamburg.de

Diese Literaturstudie wurde im Auftrag des Landesamtes für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung erstellt und mit Mitteln des Ministeriums für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg finanziert.

Diese Publikation wird im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Landesregierung Brandenburg zugänglich gemacht. Sie darf weder von Parteien noch von Wahlwerbern zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zwecke der Wahlwerbung.

## Inhalt

1.	<a href="#">Abstract</a> .....	3
2.	<a href="#">Zusammenfassung</a> .....	4
3.	<a href="#">Einleitung und Zielstellung</a> .....	6
4.	<a href="#">Überblick über die wichtigsten transgenen Veränderungen bei Forstgehölzen</a> .....	7
5.	<a href="#">Vorkommen endophytischer Bakterien in Forstgehölzen und unterschiedlichen Regenerationssystemen verschiedener Gehölze</a> .....	16
5.1.	<a href="#">Endophytische Bakterien - Definition</a> .....	16
5.2.	<a href="#">Endophytische Bakterienpopulationen in der Pflanze - allgemeine Verhaltensmuster und Populationsdynamik</a> .....	18
5.3.	<a href="#">Vorkommen endophytischer Bakterien in Forstgehölzen</a> .....	20
5.4.	<a href="#">Wirkung endophytischer Bakterien auf ihre Wirtspflanzen</a> .....	23
5.5.	<a href="#">Beeinflussung der Endophyten-Populationen durch exogene Faktoren</a> .....	25
5.6.	<a href="#">Endophytische Bakterien in Regenerationssystemen</a> .....	25
5.7.	<a href="#">Überblick über Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung</a> .....	29
5.7.1.	<a href="#">Isolation endophytischer Bakterien</a> .....	29
5.7.2.	<a href="#">Nachweis, Quantifizierung und Identifizierung der Endophyten</a> .....	31
6.	<a href="#">Persistenz von Agrobakterien in transgenen Kulturen und Überblick über die Nachweismethoden</a> .....	35
6.1.	<a href="#">Persistenz</a> .....	35
6.2.	<a href="#">Nachweismethoden</a> .....	37
6.2.1.	<a href="#">Anreicherungskulturen</a> .....	38
6.2.2.	<a href="#">Mikrobiologische, biochemische und immunologische Methoden</a> .....	39
6.2.3.	<a href="#">Molekulare Identifizierungsmethoden</a> .....	40
7.	<a href="#">Mechanismen des DNA-Transfers bei Bakterien mit besonderem Bezug auf Agrobacterium</a> .....	42
7.1.	<a href="#">Konjugation</a> .....	42
7.1.1.	<a href="#">Eigenschaften natürlicher Transfersysteme</a> .....	44
7.1.1.1.	<a href="#">Broad-host-range-Plasmide der IncP1-Gruppe</a> .....	44
7.1.1.2.	<a href="#">Struktur der Ti-Plasmide von <i>Agrobacterium tumefaciens</i></a> .....	47
7.1.1.3.	<a href="#">Vermittlung des konjugativen Transfers durch das vir-System</a> .....	51
7.1.2.	<a href="#">Eigenschaften binärer Plasmidvektoren für die Pflanzentransformation</a> .....	53
7.1.3.	<a href="#">Möglichkeiten eines konjugativen Gentransfer transgener DNA aus rekombinanten <i>Agrobacterium</i>-Stämmen</a> .....	56
7.2.	<a href="#">Transformation</a> .....	59
7.2.1.	<a href="#">Natürlich kompetente Bakterien</a> .....	60
7.2.2.	<a href="#">Modelle der DNA-Aufnahme und -integration</a> .....	62
7.2.3.	<a href="#">Möglichkeiten der Transformation endophytischer Bakterien mit rekombinanter <i>Agrobacterium</i>-DNA</a> .....	66
8.	<a href="#">Danksagung</a> .....	67
9.	<a href="#">Literatur</a> .....	67

## 1. Abstract

Conventional breeding of woody plants is now being complemented with genetic engineering techniques that allow a specific modification in the plant phenotype through the introduction of foreign genes. The resulting transgenic plants are able to express new traits such as pest and disease resistance, tolerance to herbicides, modifications of wood properties or detoxification of pollutants. Presently, numerous genetically modified trees have already been grown in field trials, as well as in commercial plantations. Transgenic woody plants are mainly produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. After transformation, recombinant agrobacteria are often able to persist in plant tissue for a longer time. In vitro regeneration systems of these woody plants were found to be occupied by endophytic bacteria. The close contact between agrobacteria and bacterial endophytes could result in a potential risk of a horizontal gene transfer. Against this background, the study gives an overview on the possibilities of transgen and binary vector transfers, via bacterial conjugation or transformation. Beside this, the study describes the occurrence and detection methods of endophytes in woody plants.

Based on the elementary mechanisms in bacterial conjugation and the biological properties of recombinant agrobacteria used for transformation, there are theoretically three ways of conjugative transfer that seem relevant. The conjugation of binary vectors mobilized by the helper plasmid, as well as the transfer of T-DNA into bacteria was not shown so far, but ought to be possible. The third way could be the mobilization of binary vectors by an external helper plasmid from the endophytic microflora, which is able to complete the mob region and to mobilize the vector. Although this represents a limiting factor, the three-parental mating is a well known technique under defined laboratory conditions. Besides the molecular prerequisites, the structure of the endophytic community is also important in finally assessing the probability of gene transfer by conjugation. Thus, transfer events between *Agrobacterium* strains should be more probable than into more or less distantly related taxa. Although there is evidence of a lot of bacterial groups belonging to Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes in different plants, systematic studies concerning the endophytic bacteria of forest trees are hardly available. Such studies need to be considered in future investigations.

Just as bacterial conjugation, gene transfer via transformation can not be excluded. However, the transfer is not only limited by the occurrence of free transformable DNA, but first of all by the restrictions resulting from the competence system of bacteria and the lack of sequence homologies in transgenic DNA.

The considerations of gene transfer from agrobacteria into endophytic bacteria are generally theoretical. However, it can be assumed that potential transfer events occur depending on the community structure of endophytic bacteria and its dynamic during plant ontogenesis. Different population densities of bacteria were already found in plant regeneration systems to vary with the kind of treatment and age of culture. Moreover, the growth and cultivation conditions of plants do influence the development of endophytes as well.

## 2. Zusammenfassung

Neben gentechnisch veränderten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen gibt es inzwischen eine Vielzahl von transgenen Forstgehölzen, die sich zum Teil in der Erprobungsphase (Labor- und Gewächshaus, bzw. Freisetzungsversuche) aber auch schon im kommerziellen Anbau befinden. Zu den gentechnischen Veränderungen gehören Merkmale zur Steigerung der Toleranz gegen biotische und abiotische Schadfaktoren sowie zur Verbesserung des Wachstums (z.B. Herbizid- und Schaderregerresistenz, Stresstoleranz, Wachstumsregulation), Produkteigenschaften (z.B. Holzqualität, Ligningehalte) und die Fähigkeit zum Abbau oder zur Entgiftung von Schadstoffen. Bei der Herstellung der gentechnisch veränderten Bäume wird vorrangig das *Agrobacterium*-System zur Transformation benutzt. Nach der Transformation sind die rekombinanten Agrobakterien oft in der Lage, längere Zeit im Pflanzengewebe der Bäume zu persistieren. Ebenso sind in *in vitro* Regenerationssystemen von Forstgehölzen endophytische Bakterien nachgewiesen worden. Aus diesem engen Kontakt ergibt sich die potentielle Möglichkeit des horizontalen Gentransfers. Davon ausgehend wurden in der Studie Möglichkeiten der Übertragung der Transgene bzw. der binären Vektoren über Konjugation und Transformation aufgezeigt. Darüber hinaus beschreibt die Studie das Vorkommen und die Nachweismethoden von Endophyten in Bäumen.

Basierend auf den Eigenschaften der rekombinanten Agrobakterien, die zur Pflanzen- transformation verwendet werden, ergeben sich drei prinzipielle Möglichkeiten für den konjugativen Gentransfer. Sowohl die Konjugation der binären Vektoren (mobilisiert durch das Helferplasmid) als auch der T-DNA-Transfer in Bakterien sind bisher nicht nachgewiesen, letztlich ist ein konjugativer Transfer jedoch als wahrscheinlich anzunehmen. Selbst bei einem Nachweis des Transfers auf Kulturmedien bliebe aber offen, inwieweit dieser Prozess auch innerhalb der Pflanze zwischen Agrobakterien und endophytischen Bakterien auftritt. Für die dritte Möglichkeit, der Mobilisierung des binären Vektors durch ein

externes Plasmid aus der Endophytengemeinschaft, müssen eine Reihe von Vorbedingungen erfüllt sein. Dieser Transfer ist an spezifische binäre Vektoren (Vorhandensein eines bestimmten *oriT* zur Mobilisierung) und an das Vorhandensein entsprechender konjugativer Plasmide in den Endophyten gebunden, die den *mob*-Bereich komplementieren und so den Vektor mobilisieren können. Eine solche Spezifität sollte die Wahrscheinlichkeit des Transfers einschränken, jedoch ist dieser prinzipielle Transferweg beschrieben und seit langem bekannt. Generell ist eine Konjugation in der Endophytenmikroflora in Forstgehölzen nicht auszuschließen. Sie wurde ausgehend von einem *Burkholderia*-Stamm mit einem konjugativen Plasmid in Pappeln nachgewiesen (Taghavi *et al.*, 2005). Für die endgültige Beurteilung der Wahrscheinlichkeit des Gentransfers ist auch die Zusammensetzung der Endophytengemeinschaft ausschlaggebend. So wäre zum Beispiel die Konjugation zwischen *Agrobacterium* Stämmen wahrscheinlicher als innerhalb der Proteobakterien. Obwohl bereits eine Vielzahl bakterieller Gattungen der *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Firmicutes* in unterschiedlichen Pflanzen nachgewiesen wurde, gibt es bisher nur wenige systematische Studien zur Endophytenmikroflora von Forstgehölzen.

Ähnlich wie die Konjugation kann auch der Gentransfer über Transformation nicht ausgeschlossen werden, einen Nachweis für die bakterielle Transformation in der Endophytenmikroflora gibt es bisher nicht. Vorbedingung für die Transformation wäre zum einen das Vorkommen natürlich kompetenter Bakterienarten (einzelne Arten wie *Acinetobacter* gehören durchaus zu den typischen endophytischen Bakterien) ebenso wie das Vorhandensein der Umweltbedingungen für das Erreichen der Kompetenz. In natürlichen Gemeinschaften wie der Endophytenmikroflora sind jedoch diese Bedingungen schwer abschätzbar. Der Gentransfer in die endophytischen Bakterien über die Transformation dürfte neben dem Vorhandensein von freier, transformierbarer DNA in Pflanzengewebe vor allem durch die limitierenden Größen begrenzt sein, die sich aus dem Kompetenzsystem der Bakterien und aus den meist fehlenden homologen Bereichen und der damit verbundenen sehr geringen Frequenz der illegitimen Rekombination ergeben.

Die prinzipiellen Betrachtungen zum Gentransfer von *Agrobacterium* in die endophytischen Bakterien *via* Konjugation oder Transformation sind rein theoretisch und wie bereits erwähnt bisher durch keine experimentellen Befunde belegt. Auszugehen ist jedoch davon, dass potentielle Transferereignisse in Abhängigkeit von der aktuellen Struktur und der Entwicklung der bakteriellen Endophytengemeinschaften auftreten. Bereits in den Regenerationssystemen wurden je nach Behandlung und Alter unterschiedliche Zelldichten

von endophytischen Bakterien nachgewiesen. Ebenso ändern sich die Endophyten-gemeinschaften mit dem Wachstum und den Kultivierungsbedingungen der Pflanzen.

### **3. Einleitung und Zielstellung**

Das Land Brandenburg hat aufgrund seiner vorwiegend sandigen Böden ein hohes Potential zum Anbau und der Nutzung von Energieholz auf landwirtschaftlich unrentablen Grenzstandorten (von Wühlisch, 2005). Der Ausbau dieses gegenwärtig noch schwachen Marktsegmentes ist sowohl vor dem Hintergrund der steigenden Nachfrage nach Biobrennstoffen und der Entwicklung innovativer Technologien der Holzverarbeitung als auch aus der Sicht der Senkung der CO<sub>2</sub>-Emissionen von wirtschaftlichem und gesellschaftlichem Interesse. Voraussetzung für einen zukunftsträchtigen Energieholzanbau sind jedoch leistungsfähige und ertragsstabile Nutzholzbestände. Nach internationaler Erfahrung besitzt insbesondere die Aspe (Zitterpappel) durch ihre geringen Ansprüche und ihre Schnellwüchsigkeit eine gute Eignung zur Etablierung rentabler Bestände (Triebel, 2005). Aus diesem Grunde werden Pappeln wie auch andere geeignete Baumarten zur weiteren Optimierung ihrer wirtschaftlichen Nutzung züchterisch bearbeitet. Wichtige Zuchtziele sind u.a. die Verbesserung der Resistenz gegenüber Schaderregern und die Erhöhung der Trockentoleranz. Hierbei werden in den internationalen Zuchtprogrammen seit mehreren Jahren gentechnische Methoden in breitem Umfang genutzt, so dass derzeit bereits eine Reihe praxisreifer Zuchtstämme mit transgenen Eigenschaften zur Verfügung steht.

Ausgehend von der bisherigen und auch zukünftig zu erwartenden Nutzung der Gentechnik bei der Züchtung von Forstgehölzen soll die Literaturstudie einen Überblick über die Möglichkeiten (Risikopotential) eines horizontalen Gentransfers in Forstgehölzen dokumentieren. Im Mittelpunkt der Studie steht die Problematik des potentiellen Gentransfers von den zur Pflanzentransformation benutzten Agrobakterien auf endophytische Bakterien in Bäumen.

Bei der Erzeugung transgener Gehölze werden binäre Vektoren verwendet, die aus den natürlich vorkommenden tumorinduzierenden (Ti)- Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* entwickelt wurden. Mit Hilfe dieser Vektorsysteme wird die zu übertragende DNA in die Pflanzenzellen eingeschleust und stabil in deren Genom eingebaut. Über bakterielle Konjugation könnten diese Plasmide auch in andere Bakterien übertragen werden. Durch das Vorhandensein endophytischer Bakterien in den Bäumen besteht somit ein Risiko des horizontalen Gentransfers, das bisher nur unzureichend oder gar nicht beschrieben bzw.

geprüft wurde. Durch die relativ lange Persistenz der Agrobakterien im Gewebe von Gehölzen wird der potentielle konjugative Transfer noch begünstigt.

Im Einzelnen soll die Literaturstudie nach einem einleitenden Überblick über die bereits erzeugten transgenen Gehölze Möglichkeiten des horizontalen Gentransfers über Konjugation bzw. Transformation in endophytische Bakterien aufzeigen. Eine Grundlage hierfür stellen auch die Daten zum Vorkommen von Endophyten in Forstgehölzen und zur Persistenz von Agrobakterien in transformierten Pflanzen dar. Aus den Möglichkeiten des horizontalen Gentransfers der Transgene, der Zelldichte und der Zusammensetzung der Endophyten-gemeinschaft sowie der Persistenz der rekombinanten Agrobakterien ergibt sich letztlich das Risikopotential der Etablierung der Transgene in der Endophytenmikroflora.

Weiterhin soll die Literaturstudie einen Überblick über Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung der Endophyten in Forstgehölzen geben. Basierend auf dieser Studie sollen Schlussfolgerungen für den weiteren Forschungsbedarf zur Untersuchung der Persistenz, Verbreitung und Etablierung von Transgenen in der Umwelt ausgehend von transgenen Bäumen gezogen werden.

#### **4. Überblick über die wichtigsten transgenen Veränderungen bei Forstgehölzen**

Der Durchbruch für gentechnische Veränderungen in Pflanzen gelang 1982 in den USA, als in einem Modellversuch erstmals ein Antibiotika- Resistenzgen aus einem Mikroorganismus auf eine Tabakpflanze übertragen wurde (Schell *et al.*, 1982). Seitdem sind bei einer Vielzahl von Pflanzenarten wie zum Beispiel Mais, Reis, Baumwolle, Raps, Gerste, Weizen, Sojabohne, Papaya fremde Gene übertragen worden. Vor allen in der Züchtung bringt der Einsatz gentechnischer Methoden den Vorteil, dass die teilweise sehr langen Züchtungszeiten entscheidend verkürzt werden. Dies eröffnet besonders bei den Forstpflanzen ein weites Feld neuer Möglichkeiten, weil aufgrund der extrem langen Generationszeiten der Bäume bei konventionellen Züchtungsmethoden oft erst nach Jahrzehnten ein Ergebnis festzustellen ist (Tzfira *et al.*, 1998; Poupin & Arce-Johnson, 2005). Eine ausführliche Zusammenfassung zur gegenwärtigen Entwicklung auf dem Gebiet der transgenen Gehölze ist in Vorbereitung und wird voraussichtlich 2006 erscheinen (Fladung & Ewald, in Druck).

Im Vergleich mit gentechnisch veränderten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen, die bereits weltweit kommerziell angebaut werden, spielen transgene Gehölze bislang allerdings noch eine untergeordnete Rolle. Seit dem ersten offiziell bekannten Freisetzungsvorfall mit transgenen Pappeln innerhalb der EU in Belgien 1988 ist die Zahl der Freisetzungen

gentechnisch veränderter Bäume inzwischen auf 192 angestiegen (Stand 2004, European Commission, Joint Research Center, Biotechnology & GMOs). In Deutschland wurde 1996 von der BFH, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung Großhansdorf der erste Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Zitterpappeln begonnen (Fladung & Scholz, 2003).

Tabelle 1: Überblick über die wichtigsten Zuchtziele bei Gehölzen mit gentechnischen Methoden ([www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de), verändert).

Regulation von Wachstum und Entwicklung	erhöhtes Wachstum, Steigerung der Biomasseproduktion verbesserte Bewurzelung von Stecklingen Veränderung der Wuchsform Erzeugung von reproduktiver Sterilität Verkürzung der juvenilen Phase <b>Bei Obstgehölzen:</b> Erhöhung des Ertrages
Verbesserung der Produktqualität	<b>Bei Forstgehölzen:</b> Verringerung und / oder Veränderung der Ligninzusammensetzung <b>Bei Obstgehölzen:</b> Kontrolle der Fruchtreifung Verbesserung der Haltbarkeit und Lagerfähigkeit von Früchten Verringerung des Allergengehalts <b>Bei Ziergehölzen:</b> Veränderung der Blütenfarbe und - haltbarkeit Erhöhung der Produktion von Duftstoffen
Erzeugung von Resistenzen gegen Pathogene und Schädlinge	Insektenresistenz Bakterienresistenz Pilzresistenz Besonders <b>bei Obstgehölzen:</b> Virusresistenz
Herbizidresistenz	
Toleranz gegenüber abiotischen Stressfaktoren	Toleranz gegenüber Hitze, Trockenheit, Versalzung, Frost, Ozon, Schwermetalle
Fähigkeit zum Abbau oder zur Entgiftung von Schadstoffen	

In den USA gibt es bereits eine erste Marktzulassung für Papaya mit gentechnisch erzeugter Virusresistenz (Haas 2001), in China wurden 2002 die ersten transgenen Schwarzpappelklone mit einer Insektenresistenz zur kommerziellen Anpflanzung freigegeben. Die rasante Zunahme der Freisetzungsversuche lässt vermuten, dass eine generelle Marktfreigabe für transgene Gehölze auch innerhalb der EU in den nächsten Jahren nicht auszuschließen ist.



Wesentliche Ziele für die Erzeugung transgener Gehölze mit kommerzieller Bedeutung sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Wachstumsregulation:** Pflanzenentwicklung und Wachstum werden durch das Zusammenwirken verschiedener Phytohormone wie Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Ethylen und Abscisinsäure gesteuert.

Durch Einführung der in die Auxinbiosynthese involvierten *Agrobacterium tumefaciens*-Gene *iaaM* und *iaaH* konnten Eigenschaften wie Größe, Stammdurchmesser, Verzweigung oder Xylemstruktur von Aspen (*Populus tremuloides*) signifikant verändert werden (Tuominen *et al.*, 1995). Eriksson *et al.* (2000) transformierten Aspenklone mit dem aus *Arabidopsis* stammenden GA-20-Oxidase-Gen, das als Schlüsselgen bei der Regulation der Gibberellinbiosynthese beschrieben wurde. Die transgenen Aspen zeichneten sich gegenüber den Kontrollen durch deutlich gesteigerte Wachstumsraten aus - eine Eigenschaft, die besonders für die Verwendung der Pappel als nachwachsender Rohstoff von Bedeutung ist. Außerdem wurde aufgrund des erhöhten Gehaltes an freiem Gibberellin, das an Prozessen wie Blüte, Samenkeimung und Differenzierung der Xylemfasern beteiligt ist (Kende & Zeevaart, 1997), eine Verlängerung der Sprossinternodien und damit der Zellulosefasern erreicht, was einen großen Gewinn für die Produktion von festem Papier darstellt. Auch die Blockierung der Ethylenbiosynthese durch Insertion einer Kombination von zwei Genen (ACC-Synthase-Gen/ACC-Oxidase-Gen (ACOACS) als Antisense-Genkonstrukt ergab neben der Reduktion der Ethylensynthese eine Zuwachssteigerung bei Pappeln (Li *et al.*, 1999).

Die Überexpression der aus *Agrobacterium rhizogenes* stammenden Wachstumshormone-Gene *rolA*, *rolB* und *rolC* führte in transformierten Pappeln und Aspen zu veränderten Wachstums- und Wurzeleigenschaften. Durch die Expression des *rolC*-Gens in Hybridaspens wurde Zwergenwuchs mit verminderter Apikaldominanz, Wachstumsraten und Internodienabständen induziert (Nilsson *et al.*, 1996). Außerdem war der *rolC*-Phänotyp durch veränderte Phytohormonproduktion der transformierten Pflanzen gekennzeichnet (Tzifira *et al.*, 1998). Das *rolC*-Gen eignet sich auch als Markergen zur Untersuchung der Stabilität fremder Gene in transgenen Pappelklonen, da das Gen deutliche phänotypische Merkmale wie niedrigen Wuchs und hellere Blattfarbe vermittelt und so die Eliminierung oder das Ausschalten des eingebauten Gens angezeigt wird (Fladung, 1999; Kumar & Fladung, 2001).

Effekte, die durch die Expression der *rolABC*-Gene auftreten, könnten weiterhin für die Entwicklung bestimmter Wachstumstypen wie Zwergenwuchs bei Obstbäumen oder zur Optimierung der Zelluloseproduktion genutzt werden (Tzifira *et al.*, 1998).

Freilanduntersuchungen mit transgenen Hybridpappeln, die ein Glutaminsynthetase (GS)-Gen aus der Kiefer exprimieren, zeigten nach drei Jahren ein um 41% größeres Wachstum als die Kontrollpflanzen, höhere Proteingehalte in Blättern und Borke und eine gesteigerte Aktivität von GS und Glutamatsynthase (Jing *et al.*, 2004). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Modifizierung der GS-Expression zukünftig besonders bei der Nutzung für Kurzumtriebsplantagen von Bedeutung sein kann.

**Holzqualität/Ligningehalt:** Gentechnische Veränderungen der Holzkomponenten Lignin, Zellulose und Hemizellulose eröffnen neue Perspektiven für die Holz- und Papierindustrie. Bei der Verarbeitung von Holz zu Papier muss Lignin in aufwendigen und umweltbelastenden Verfahren (Kochen in Sulfitlaugen) von der Zellulose getrennt werden, um reine Zellulosefasern zu gewinnen. Eine Anwendung gentechnischer Methoden bei Bäumen besteht deshalb darin, den Ligningehalt des Holzes zu verringern und die Struktur des Lignins so zu verändern, dass es leichter aus dem Holz herausgelöst werden kann (Pilate *et al.*, 2002).

Verschiedene Versuche, den Ligningehalt zu reduzieren, brachten zuerst keinen Erfolg, es konnte lediglich eine Änderung der Ligninstruktur erreicht werden (Sederoff, 1999). Transgene Hybridpappeln mit reduzierter Kaffeoyle-O-Methyltransferase (COMT)- bzw. Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD)- Aktivität zum Beispiel zeigten eine drastische Verschiebung der Ligninzusammensetzung hinsichtlich des Syringyl/Guaiacyl-Verhältnisses, das für den Holzaufschluß entscheidend ist (Lapierre *et al.*, 1999; Jouanin *et al.*, 2000).

Hu *et al.* (1999) gelang schließlich durch Einführung eines Antisense-Genkonstrukts in Aspen die Hemmung der 4-Cumarat-CoA Ligase (4CL) und damit eine Verringerung des Ligningehaltes um 45%. Gleichzeitig wurde der Zelluloseanteil um 15% gesteigert und die Wachstumsrate nahm deutlich zu.

Durch Cotransfer von zwei an der Ligninsynthese beteiligten Genen (antisense 4CL und sense CAld5H-Gene) konnten Li *et al.* (2003) bei transgenen Aspen, die beide Transgene exprimieren, neben einer Ligninreduktion um bis zu 52% und einer Steigerung der Zelluloseproduktion um bis zu 30% das Syringyl/Guaiacyl-Verhältnis um 64% erhöhen.

**Insektenresistenz:** Insektenfraß verursacht große Schäden im Forstbereich. Durch die häufig angewendete Plantagenwirtschaft wird die schnelle Vermehrung der Schadinsekten noch zusätzlich begünstigt. Mit Hilfe der Gentechnik ist es über den Einbau von Insektenresistenzgenen möglich, die Schäden wirksam einzuschränken. Dabei besitzen Transgene, die von *Bacillus thuringiensis* (Bt) stammen und für verschiedene aktive Endotoxine gegen

unterschiedliche Insektenarten codieren, besondere Bedeutung. Mit Hilfe gentechnischer Verfahren können die Bt-Toxin-Gene auf Pflanzen übertragen werden und produzieren dann in den Pflanzenzellen den für Fraßinsekten giftigen Wirkstoff. Es gibt verschiedene Bt-Toxin-Gene, die spezifische Toxine gegen einzelne Insektengruppen bilden. So wirken zum Beispiel verschiedene Cry-Toxine gegen Lepidopteren, Coleopteren oder Dipteren, die Cyt-Toxine dagegen nur gegen Dipteren.

Die ersten insektenresistenten transgenen Pappeln wurden 1991 von McCrown *et al.* (1991) durch Transformation mit einem Plasmid mit einem integrierten *CryIAa*-Gen von *Bacillus thuringiensis* produziert. Weitere Bäume, die mit unterschiedlichen Bt-Toxin-Genen transformiert wurden, waren unter anderem Fichte, Apfel und Lärche (Schuler *et al.*, 1998; Tzifira *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1993). Im Jahre 2003 wurden in China erstmals drei Bt-Schwarzpappel (*Populus nigra*)-Klone für den Handel zugelassen (Wang, 2004). In mehrjährigen Feldversuchen mit Bt-*CryIAC*-transgenen Pappeln konnte eine sehr gute Insektenresistenz gegenüber den in diesem Gebiet vorkommenden Fraßinsekten (Lepidopteren) nachgewiesen werden (Ewald & Han, 1999; Wang *et al.* 1996).

Die Arbeit mit anderen Insektenresistenzgenen - als Alternative zum Bt-Toxin-Gen - brachte bisher weniger Erfolg. Proteinaseinhibitoren ergaben nach Expression in Pappeln nur eine geringe oder keine Resistenz (Confalonieri *et al.*, 1988; Leple *et al.*, 1995; Delledone *et al.*, 2001). Allerdings war durch Kombination mehrerer Resistenzgene, wie zum Beispiel Bt-*CryIAC* und *API* (Arrowhead Proteinase Inhibitor), eine Resistenzsteigerung gegenüber bestimmten Insekten möglich (Yang *et al.*, 2003).

**Pilzresistenz:** Die gentechnische Erzeugung von pilzresistenten Pflanzen ist sehr schwierig, weil dazu die Übertragung und koordinierte Expression einer Vielzahl verschiedener Gene notwendig ist (Dixon, 2001). Außerdem sind viele Pilzarten in der Lage, sehr schnell die von der Pflanze gebildeten Fungizide zu entgiften und unschädlich zu machen (Maloney & Vanetten, 1994). Trotz der Schwierigkeiten war es möglich, durch Übertragung und Expression von Genen, die für hydrolytische, zellwandzerstörende Enzyme wie Chitinasen oder Glucanasen codieren, pilzresistente Pflanzen zu erzeugen (Faize *et al.*, 2003; Grover & Gowthaman, 2003; Carstens *et al.*, 2003).

Eine erhöhte Resistenz gegenüber *Septoria musiva*, einem bedeutenden Erreger des Rindenkrebsses, wurde durch Expression des Oxalatoxidase-Gens (*OxO*), das eine entscheidende Rolle bei der Stressbewältigung und der Pathogenabwehr spielt, in transgenen

Pappeln erzielt. Ähnliche Ergebnisse brachte die Übertragung von Genen, die für die chitinbindenden Proteine Ac-AMP1.2 und ESF12 kodieren (Liang *et al.*, 2001; 2002).

Weitere Gene, die mit dem Ziel der Erzeugung einer Pilzresistenz in Pflanzen übertragen wurden, sind das Stilben-Synthase-Gen (*Vst1*) aus der Weinrebe, das an der Phytoalexinsynthese beteiligt ist, und ein Gen für ein Polygalacturonase-hemmendes Protein (PGIP) aus der Kiwipflanze (Szankowski *et al.*, 2003; Giorcelli *et al.*, 2004).

Gegenwärtig arbeiten verschiedene Gruppen daran, mit Hilfe gentechnischer Methoden ein Mittel gegen das durch den Pilz *Ophiostoma novo-ulmi* verursachte Ulmensterben (Dutch elm disease) in Nordamerika, Asien und Europa zu finden. Eine vielversprechende Möglichkeit ist die Transformation von Genen, die eine bestimmte Gruppe von antimikrobiellen Peptiden (Osuski *et al.*, 2000) codieren und so zur Steigerung der Resistenz gegenüber verschiedenen Krankheitserregern führen ([www.esf.edu/PUBPROG/elm/default.htm](http://www.esf.edu/PUBPROG/elm/default.htm)).

Eine andere Variante ist die Übertragung der Ri-Plasmid-*rol*-Gene von *Agrobacterium rhizogenes* auf Ulmen (Gartland *et al.*, 2001). Durch Expression dieser Gene wird eine Veränderung des Pflanzengewebes und vor allem der Xylemgefäße induziert, die die Ansiedlung und Verbreitung des pathogenen Pilzes verhindert (Lambert *et al.*, 1998).

**Virusresistenz:** Viren stellen vor allem im Obstanbau ein großes Problem dar. Die Erzeugung von Virusresistenzen mittels gentechnischer Methoden ist relativ weit fortgeschritten. Eine schon bei verschiedenen Pflanzen angewendete Technik ist die „Hüllprotein-Resistenz-Methode“ (Hackland *et al.*, 1994). Durch Expression des viralen p25 Hüllproteingens des Citrus Tristeza Virus (CTV) konnte die Virusresistenz bei Mexikanischen Limonen (*Citrus aurantifolia*) signifikant erhöht werden (Dominguez *et al.*, 2002). Auf Hawaii werden transgene Papayaklone, die in umfangreichen Feldversuchen eine fast 100%ige Resistenz gegenüber dem Papaya Ringspot Virus zeigten, bereits kommerziell angebaut (Ferreira *et al.*, 2002; PEW, 2002; Sedjo, 2004).

**Herbizidresistenz:** Die Resistenz gegenüber Herbiziden ist notwendig, um das Aufkommen von jungen Bäumen bei dichtem Unterwuchs zu erleichtern. Dadurch werden Aufforstungen von extrem unkrautverseuchten Gebieten möglich, die sonst für Bepflanzungen ökonomisch ungeeignet sind (Walter *et al.*, 2002).

Das Herbizid Glyphosat (Round up) greift durch Wirkung auf die 5-Enolpyruvat-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSP)-Aktivität, die durch das *aroA*-Gen codiert wird, in die pflanzliche Biosynthese aromatischer Aminosäuren ein. Eine geringere Sensibilität gegenüber Glyphosat

wurde von Fillati *et al.* (1987) durch Expression von *aroA* aus *Salmonella typhimurium* in Pappelhybriden und von Shin *et al.* (1994) in europäischen Lärchen beobachtet, wobei die Herbizidresistenz bei der Lärche mit einem reduzierten Wachstum der transgenen Bäume verbunden war. Eine weitere Steigerung der Glyphosat-Resistenz wurde dadurch erreicht, dass *aroA* mit Hilfe eines entsprechenden Signalpeptids in den Chloroplasten und nicht wie ursprünglich im Cytosol exprimiert wurde (Donahue *et al.*, 1994). Auch durch die Insertion des Glyphosat-Resistenzgens CP4, das eine alternative Form des EPSPS-Gens aus *Agrobacterium* CP4 darstellt (Barry *et al.*, 1992), konnte eine Resistenz in transgenen Pappellinien erzeugt und in zweijährigen Feldversuchen nachgewiesen werden (Meilan *et al.*, 1992).

Miranda Brasileiro *et al.* (1992) konnten nach Expression eines mutierten Acetolactat-Synthase-Gens von *Arabidopsis thaliana* eine Chlorsulfuron (Glean)-Resistenz in transgenen Pappeln nachweisen.

Durch Verwendung des *bar*-Gens, das das Enzym Phosphinothricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus* codiert, wurde in der Zuckerhutfichte (*Picea glauca*) eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Phosphinothricin (Basta) erreicht (Ellis *et al.*, 1993). Transgene Pappeln mit einer ausgeprägten Basta-Resistenz in Feldversuchen wurden von Strauss *et al.* (1998) und Confalonieri *et al.* (2000) beschrieben.

**Stresstoleranz:** Im Allgemeinen sind Bäume an ihre natürlichen Umgebung gut angepasst. In zunehmendem Maße sollen sie aber auch an schwierigen Standorten gedeihen. Besonders bei Aufforstungsvorhaben und in der Plantagenwirtschaft werden Bäume abseits von ihren gewohnten Standorten eingesetzt, was je nach Bedarf eine Toleranz gegenüber unterschiedlichen Faktoren wie Trockenheit, Salz, extremen Lichtverhältnissen oder Frost erfordert.

Gegenwärtig wird intensiv an der Übertragung von Genen gearbeitet, die den Bäumen eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen verleihen (Wang *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000). Ein Problem dabei ist, dass die molekularen Grundlagen für die Etablierung der Toleranz gegenüber Umweltparametern sehr komplex und noch nicht ausreichend erforscht sind.

Als Antwort auf verschiedene biotische und abiotische Stressfaktoren, wie zum Beispiel Kälte, Ozon, Schwermetallbelastung, Herbizideinwirkung oder Pathogenbefall bilden Pflanzen reaktive Sauerstoffverbindungen ( $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) (Noctor & Foyer, 1998), die einen extremen oxidativen Druck auf die Pflanzen ausüben. Ein Mechanismus zum Schutz der

pflanzlichen Zellen vor diesen aggressiven Verbindungen ist die Bildung antioxidativ wirksamer Pflanzeninhaltsstoffe wie Ascorbat oder Glutathion, die in reduziertem Zustand mit den verschiedenen Sauerstoffverbindungen reagieren und sie dadurch unschädlich machen (Ushimaru *et al.*, 1999; Sies, 1995; Herschbach & Kopriva, 2002). So konnte bei transgenen Pappeln mit modifiziertem Glutathion-Metabolismus oder durch Überexpression von Enzymen, die an der Bindung der reaktiven Sauerstoffverbindungen beteiligt sind, eine erhöhte Stressresistenz nachgewiesen werden (Nicolescu *et al.*, 1996; Arisi *et al.*, 1998). Foyer *et al.* (1995) zeigten, dass durch die überdurchschnittliche Produktion von reduziertem Glutathion in transgenen Pappeln die Empfindlichkeit gegenüber Lichtstress herabgesetzt wird. Eine Toleranz gegenüber Ozon konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Will *et al.*, 1997; Strohm *et al.*, 1999). Liu *et al.* (2000) beschrieben bei transgenen Pappeln, die das *mtID*-Gen exprimieren, eine starke Toleranz gegenüber Salzstress bis zu Konzentrationen von 0,4% NaCl im Medium. Auf dem Gebiet der Frosttoleranz wurden erste Untersuchungen zur Klonierung von Frostresistenz-Genen und Übertragung auf Pappeln durchgeführt (Lin *et al.*, 2000; Lin, 2001).

**Phytosanierung:** Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für transgene Bäume ist die Sanierung von Böden auf alten Industriestandorten oder Deponiegeländen, die mit organischen Schadstoffen oder Schwermetallen verseucht sind. Pappeln sind für diesen Zweck besonders geeignet, da sie schnell wachsen, tiefe Wurzeln ausbilden und schon von Natur aus in der Lage sind, Schwermetalle aus dem Boden aufzunehmen. Gordon *et al.* (1998) konnten in Feldversuchen nachweisen, dass gentechnisch veränderte Pappeln mit der Fähigkeit, Trichlorethylen (TCE) abzubauen, bis zu 95% dieses bedeutenden Umweltgiftes in verseuchten Böden in Chlorid-Ionen und CO<sub>2</sub> zersetzen. Ähnliche Ergebnisse wurden beim Abbau anderer organischer Verbindungen wie z.B. RDX und TNT mit Hilfe transgener Pappeln beschrieben (Thompson *et al.*, 1999).

Tulpenbäume (*Liriodendron tulipifera*), die ein modifiziertes Quecksilber-Reduktasegen (*merA*) tragen, können auf Böden wachsen, die mit Quecksilber stark kontaminiert sind und reduzieren bis zu 12 mal mehr toxisches Hg(II) zu weniger toxischem elementarem Hg(O) als nicht transformierte Bäume (Rugh *et al.*, 1998; Rugh, 2001). Untersuchungen an transgenen Graupappeln (*Populus tremula x P.alba*), die das Gen für  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthase (*gshI*) von *E. coli* exprimieren, ergaben im Vergleich zu den Kontrollen eine bis zu 4 mal höhere Ansammlung von reduziertem, antioxidativ wirkenden Glutathion in den Blättern. In Gewächshausversuchen zeigten diese Pappeln ein starkes Potential für die Akkumulation und

Entgiftung von Schwermetallen und Pestiziden, das gegenwärtig im Freiland getestet wird (Peuke & Rennenberg, 2005).

In den USA werden transgene Pappeln getestet, die durch Insertion des menschlichen Cytochrom-Gens P4502E1 modifiziert wurden. Das Cytochrom oxidiert eine Reihe von giftigen organischen Kohlenwasserstoffen wie TCE, Vinylchlorid, Chloroform, Benzen und ergab bei Untersuchungen an transformierten Tabakpflanzen eine bis um das 640-fach erhöhte Umwandlung von TCE im Vergleich zu den nicht transformierten Pappeln (Doty *et al.*, 2000; [www.ostp.gov/html/ceq\\_ostp\\_study6.pdf](http://www.ostp.gov/html/ceq_ostp_study6.pdf)).

**Reproduktive Sterilität und Verkürzung der juvenilen Phase:** Transgene Gehölze werden in einigen Jahren einer weltweiten kommerziellen Anwendung zur Verfügung stehen. Da für gentechnisch veränderte Bäume nur in wenigen Fällen eine natürliche Sterilität beschrieben wurde (Yang *et al.*, 2003) und somit eine freie Kreuzbarkeit mit nicht gentechnisch veränderten Pflanzen der gleichen oder nahe verwandter Arten angenommen werden muss, ist ein vertikaler Gentransfer der Transgene zu erwarten (Fladung & Ewald, 2003). Um den Genfluss über Pollen und Samenverbreitung zu verhindern und sicherzustellen, dass sich die Transgene nicht in natürlichen Waldbaumpopulationen verbreiten, wurden verschiedene Strategien zur Erzeugung gentechnisch vermittelter männlicher und/oder weiblicher Sterilität von Gehölzen entwickelt. Die wichtigsten Methoden sind (1) die Insertion von Genen, die durch gewebespezifische Promotoren gesteuert werden und so in bestimmten Pflanzenteilen (Pollen, Nabe, Tapetum) eine zur Sterilität führende Genexpression cytotoxischer Gene (Suizidgene) veranlassen (Skinner *et al.*, 2003), (2) die Inhibition der Expression von Genen, die für den Blühprozeß essentiell sind auf RNA- oder Proteinebene (Strauss *et al.*, 1995, Busow *et al.*, 2005), und (3) die Verhinderung des Einsetzens der reproduktiven Phase mit Hilfe von „flowering-time-genes“ (Meilan *et al.*, 2001).

Neben der Erzeugung steriler Bäume mit fehlenden Blüten bzw. Blütenteilen ergeben sich aus der genauen Analyse des Blüh-Prozesses auch Möglichkeiten zur genetischen Kontrolle der Blühentwicklung und damit zur Verkürzung der normalerweise extensiven juvenilen Phase. Die meisten Baumarten beginnen im Vergleich zu einjährigen krautigen Pflanzen erst nach vielen Jahren zu blühen, Pappeln blühen üblicherweise erst nach fünf bis sieben Jahren (Braatne *et al.*, 1996).

*LEAFY (LFY)*, *APETALA (API)* und die *MADS* Box-Gene, die bei *Arabidopsis* als Schlüsselgene der Blühentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Egea-Cortines & Weiss, 2001), wurden in Zitrus-Arten eingeschleust. Sowohl API als auch LFY führten zur

Verkürzung der juvenilen Phase und beschleunigten den Blühbeginn, wodurch sich eine Generationszeit von einem Jahr (von Samen zu Samen) ergab (Peña *et al.*, 2001). Rottmann *et al.* (2000) konnten durch Überexpression von *PTLF*, einem zu *LFY* homologen Gen der Balsampappel (*Populus trichocarpa*), in 2 von 19 transgenen Linien verschiedener Pappelarten ein frühzeitiges Einsetzen des Blühbeginns induzieren.

Alternative Varianten zur Blühförderung, beispielsweise die Behandlung von Pappeln mit Hormonen bzw. Wachstumshemmern, haben bisher keine blühfördernde Wirkung gezeigt.

Die Gentechnik eröffnet die Möglichkeit, Bäume mit völlig neuen Eigenschaften zu schaffen und könnte damit zur Lösung verschiedener Problemstellungen im Forstbereich beitragen (Gartland *et al.*, 2003; Poupin & Arce-Johnson, 2004).

Durch den ständig steigenden Holzbedarf, der nach langfristigen Prognosen weltweit gesehen größer geschätzt wird als die Holzproduktion (Fenning & Gershenzon, 2002), steht die Forstwirtschaft vor einer großen Herausforderung. Auf der einen Seite soll die zunehmende Abholzung der Primärwälder (Urwälder) gestoppt werden, auf der anderen Seite muss der enorme Schnitt- und Industrieholzbedarf abgedeckt werden. Diese Anforderungen erfordern die Einführung neuer Technologien zur Ergänzung der traditionellen Züchtungsmethoden. Eine Möglichkeit könnte der Anbau transgener Bäume vor allem in Form von Plantagenkulturen zur Erzeugung von Spezialhölzern oder als nachwachsende Rohstoffe sein.

Vor Einführung gentechnisch veränderter Bäume in die Forstwirtschaft müssen jedoch Risiken für Mensch, Natur und Umwelt ausgeschlossen werden (Van Frankenhuyzen & Beardmore, 2004). Um eine Bewertung des Risikos vornehmen zu können, müssen Freisetzungsversuche mit den entsprechenden gentechnisch veränderten Bäumen etabliert werden, um des Verhalten dieser Bäume unter natürlichen Umweltbedingungen zu untersuchen (Fladung & Ewald, 2003).

## **5. Vorkommen endophytischer Bakterien in Forstgehölzen und unterschiedlichen Regenerationssystemen verschiedener Gehölze**

### **5.1. Endophytische Bakterien - Definition**

Endophytische Bakterien gelangen immer mehr in den Blickpunkt des Interesses, weil sie aufgrund ihres Lebensraumes innerhalb der Pflanze und der sich daraus ergebenden engen Verbindung zur Pflanze damit in Verbindung gebracht werden, ihrer Wirtspflanze bestimmte



Eigenschaften zu verleihen und an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt zu sein. Dazu gehören vor allem die positive Stimulation des Wachstums und der Entwicklung der Wirtspflanze (Bent & Chanway, 1998; Lazarovits & Nowak, 1997; Nejad & Johnson, 2000) und die biologische Kontrolle unterschiedlicher phytopathogener Organismen (Cameron *et al.*, 1994; Sturz *et al.*, 1999; Timmusk & Wagner, 1999).

Schon vor über 50 Jahren wurden Bakterien beobachtet, die im Inneren verschiedener Pflanzen leben, ohne sichtbare Schäden zu verursachen (Tervet & Hollis, 1948). Inzwischen konnten im Gewebe nahezu aller bisher untersuchten landwirtschaftlich bedeutsamen Pflanzenarten endophytische Bakterien gefunden werden. Dies lässt auf eine ubiquitäre Existenz dieser Bakterien in höheren Pflanzen schließen (Hallmann *et al.*, 1997b; Chanway, 1998).

Es gibt viele verschiedene Definitionen des „Endophyten“-Begriffs, die generell endophytisch lebende Pilze und Bakterien einschließen (Wilson, 1995). Diese Arbeit soll jedoch speziell einen Überblick über endophytische Bakterien geben.

Nach der Definition von Kado (1992) leben endophytische Bakterien im Gewebe von Pflanzen „ohne ihrem Wirt substanziellen Schaden zuzufügen oder sich mehr Vorteile zu verschaffen, als über ihren Aufenthalt in der Pflanze hinausgeht“. Diese Definition schließt die Möglichkeit einer symbiotischen Beziehung der Endophyten zur Wirtspflanze mit Vorteilen für beide Partner aus. Quispel (1992) beschränkte die Endophytendefinition auf die Bakterien, die eine Endosymbiose mit der Pflanze eingehen und ihrem Wirt dadurch einen ökologischen Vorteil bringen, was wiederum zur Ausgrenzung der Bakterien führen würde, die neutral in der Pflanze leben.

Weil bestimmte apathogene Endophyten unter besonderen Bedingungen und in Abhängigkeit vom Genotyp der Wirtspflanze pathogen werden können (Misaghi & Donndelinger, 1990), erweiterten James und Olivares (1997) den Endophyten-Begriff durch Einbeziehung aller aktiv und latent pathogenen Bakterien. Da jedoch für pathogene Bakterien keine konkreten endophytischen Stadien beschrieben wurden, wie es zum Beispiel für die pathogenen Pilze *Colletotrichum* spp. und *Acremonium* spp. der Fall ist (Bailey *et al.*, 1992; Bacon and Hill, 1996) und außerdem über den allgemeinen „Lebenszyklus“ pathogener Bakterien noch sehr wenig bekannt ist, scheint die Eingliederung der pathogenen Bakterien sehr schwierig oder fraglich (Chanway, 1998; Kobayashi & Palumbo, 2000). Auch kann eine Besiedlung durch pathogene Bakterien zu erheblichen oder totalen Gewebeerstörungen führen, die ein

„Zusammenleben“ unter normalen Bedingungen unmöglich machen und damit der eigentlichen „Endophytendefinition“ widersprechen.

Eine funktionelle Definition, die sich auf die Interaktion zwischen Endophyten und Pflanze bezieht, wurde von Hallmann *et al.* (1997b) aufgestellt. Danach werden als endophytische Bakterien die Bakterien bezeichnet, die aus oberflächensterilisiertem Pflanzengewebe isoliert oder aus dem Inneren von Pflanzen extrahiert werden können und mindestens eine Phase ihres Lebenszyklus im Inneren einer Pflanze verbringen ohne jedoch sichtbare Krankheitssymptome zu verursachen. Die Definition umfasst sowohl die Bakterien, die als neutrale Besiedler in der Pflanze leben als auch Symbionten, die der Pflanze einen ökologischen Nutzen bringen, und schließt aktiv pathogene Bakterien aus.

## **5.2. Endophytische Bakterienpopulationen in der Pflanze - allgemeine Verhaltensmuster und Populationsdynamik**

Eintrittsorte für endophytische Bakterien sind vor allem die Wurzeln und Keimwurzeln aber auch Stomata oder Läsionen in den Blättern (Kobayashi & Palumbo, 2000; Roos & Hattingh, 1983; Leben *et al.*, 1968). Das Eindringen in die Wurzeln und Keimwurzeln erfolgt vorrangig über Wunden, die auf natürliche Weise beim Wachstum der Pflanzen entstehen (Sprent & de Faria, 1988). Verschiedene Untersuchungen deuten jedoch auf eine aktive Penetration zum Beispiel durch die Produktion zellulolytischer und pectinolytischer Enzyme hin (Hurek *et al.*, 1994; Quadts-Hallmann *et al.*, 1997b)

Der Nachweis der Existenz von endophytischen Bakterien in Samen und Keimlingen durch *in situ* Hybridisierung bzw. Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA lässt vermuten, dass die Bakterien, in diesem Fall Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* und *Rahnella*, bis in die generativen Gewebe gelangen und so von einer Generation auf die andere weitergegeben werden können (Kukkurainen *et al.*, 2005; Cankar *et al.*, 2005).

Nachdem die Bakterien in die Pflanze eingedrungen sind, können sie entweder an der Eintrittsstelle verbleiben oder sich über das Gefäßsystem systemisch über die gesamte Pflanze verteilen. Die Verbreitung erfolgt über passiven Transport oder aktive Migration durch die Verbindungselemente oder den Apoplasten (Hurek *et al.*, 1994; Hallmann *et al.*, 1997b; Germaine *et al.*, 2004). Die unterschiedlichen Verbreitungsmechanismen, die zum Teil durch Interaktionen mit anderen Mikroorganismen oder besondere Anforderungen der Endophyten bedingt sind, ermöglichen die Besiedlung von Nischen, zum Beispiel Zellen bestimmter

Gewebe oder, noch spezifischer, von Interzellularen verschiedener Pflanzenorgane (Bell *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1985; Di Fiore & Del Gallo, 1995).

Die Zusammensetzung und Stärke der Besiedlung durch endophytische Bakterienpopulationen ist sehr variabel und von Art und Alter der Pflanze, Pflanzenorgan, Gewebetyp, saisonalen Schwankungen und den externen Bedingungen abhängig. Durchschnittliche Endophytenkonzentrationen liegen für unterschiedliche Pflanzenarten bei  $10^2$ - $10^7$  cfu (colony forming units) pro Gramm Pflanzenmasse, wobei die höchsten Konzentrationen im Gefäßsystem von krautigen Pflanzen erreicht werden. In holzigem Gewebe liegen die Bakterienkonzentrationen zwischen  $10^3$  und  $10^4$  cfu/g (Bell *et al.*, 1995).

Generell ist die Besiedlung der Wurzel am stärksten und nimmt in Richtung Spross und Blätter ab (Lamb *et al.*, 1996). Frommel *et al.* (1991) beobachteten, dass endophytische Bakterien dazu tendieren, unabhängig von der Inokulation in Abhängigkeit vom Pflanzengewebe eine optimale Populationsdichte zu erreichen.

Die meisten von landwirtschaftlichen Kulturpflanzen, Unkräutern und Gehölzen isolierten bakteriellen Endophyten können als fakultativ endophytisch angesehen werden und sind in der Lage, auch außerhalb der Pflanze in der Rhizosphäre, als Bodenbakterien oder in der Phylloplane zu leben (Di Fiore & Del Gallo, 1995; McInroy & Kloepper, 1994; Sturz und Nowak, 2000). Sturz und Nowak (2000) konnten nachweisen, dass viele Rhizosphärenbakterien das Wurzelgewebe penetrieren und besiedeln können und sich damit einen Weg ins Xylem öffnen. Generell wird davon ausgegangen, dass eine Fluktuation von Bakterienpopulationen zwischen endophytischer, epiphytischer und Rhizosphärenbesiedlung besteht (Hallmann *et al.*, 1997b; Misko & Germida, 2002).

Obwohl die Definition für endophytische Bakterien nach Hallmann *et al.* (1997b) pathogene Bakterien eindeutig ausschließt, sind einige Bakterienarten, die als typische Endophyten isoliert wurden, als pathogene Erreger verschiedener Krankheiten an bestimmten Wirtspflanzen bekannt. Dazu gehören coryneforme Bakterien wie verschiedene *Clavibacter* und *Curtobacterium*-Arten. Auch *Agrobacterium* spp., pathogene *Erwinia*-Arten, Xanthomonaden und eine Anzahl von pathogenen Stämmen, die als *Pseudomonas* spp. klassifiziert wurden bzw. früher in diese Gattung gehörten, wie *P. syringae*, *Burkholderia* spp. und *Ralstonia solanacearum* wurden als Endophyten nachgewiesen. Noch ist nicht geklärt, ob es sich bei diesen Isolaten um nicht pathogene Stämme von Arten handelt, die normalerweise als Erreger verschiedener Pflanzenkrankheiten identifiziert wurden. Möglich ist aber auch, dass normalerweise pathogene Isolate endophytisch, also ohne Krankheitssymptome zu

verursachen, in Pflanzen leben, die nicht zu ihrem eigentlichen Wirtsspektrum gehören (Kobayashi & Palumbo, 2000). Stämme von *Curtobacterium flaccumfaciens*, die als stark pathogen gegenüber verschiedenen Leguminosen beschrieben wurden (Hayward & Waterston, 1965), konnten zum Beispiel auch aus der Phyllosphäre von Weizenpflanzen isoliert werden (Legard *et al.*, 1994) und eignen sich zur biologischen Kontrolle von verschiedenen pathogenen Erregern an Gurkenpflanzen (Raupach & Kloepper, 2000).

### 5.3. Vorkommen endophytischer Bakterien in Forstgehölzen

Im Gegensatz zu landwirtschaftlichen Kulturpflanzen ist über endophytische Bakterien an Gehölzen noch relativ wenig bekannt. In den letzten Jahren wurden im Gewebe verschiedener Sträucher, Laubbäume und Nadelbäume endophytische Bakterien nachgewiesen, über ihre Diversität, Besiedlungsmuster und ihren Einfluss auf die Wirtspflanzen gibt es jedoch erst wenige Informationen.

Tabelle 2: Vorkommen endophytischer Bakterien unterschiedlicher Gattungen in Gehölzen

Wirt	Bakterium (Gattung)	Referenz
<i>Populus tremuloides</i> (Aspe)	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Bacillus</i>	Bacon & Mead, 1971 Knutson, 1973
<i>Quercus fusiformis</i> (Eiche)	<i>Bacillus</i>	Brooks <i>et al.</i> , 1994
<i>Acer saccharinum</i> L. (Ahorn)	<i>Bacillus</i>	Hall <i>et al.</i> , 1986
<i>Alnus</i> (Erle)	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Achromobacter</i>	Bacon & Mead, 1971
<i>Vitis vinifera</i> (Weinrebe)	<i>Curtobacterium</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Xanthomonas</i>	Bell <i>et al.</i> , 1995
<i>Ulmus</i> spp. (Ulme)	<i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Staphylococcus</i>	O'Brien <i>et al.</i> , 1984; Mocali <i>et al.</i> , 2003; Mengoni <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus</i> spp. (Kiefer)	<i>Achromobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Cellulomonas</i> ,	Bacon & Mead, 1971; Shishido <i>et al.</i> , 1995; Bent & Chanway, 2002; Laukkanen <i>et al.</i> , 2000; Dahm <i>et al.</i> , 2003; Bal & Chanway

<i>Citrus sinensis</i> (Zitrus)	<i>Enterobacter, Pseudomonas, Arthrobacter, Bacillus, Corynebacterium, Achromobacter, Acinetobacter, Vibrio, Alcaligenes, Citrobacter, Flavobacterium, Klebsiella, Providencia, Serratia, Shigella, Yersinia, Curtobacterium, Methylobacterium, Pantoea, unklassifizierte Actinomycetales- Isolate</i>	Gardner <i>et al.</i> , 1982; Araujo <i>et al.</i> , 2001
<i>Prunus persica</i> (Pfirsich)	<i>Pseudomonas</i>	Dowler & Weaver, 1975
<i>Pyrus communis</i> (Birne)	<i>Pseudomonas</i>	Whitesides & Spotts, 1991
<i>Robinia pseudoacacia</i> (Robinie)	<i>Curtobacterium, Mesorhizobium, Rhizobium</i>	Naujoks <i>et al.</i> , 2000
<i>Populus</i> spp. (Pappel)	<i>Methylobacterium, Flavimonas, Herbaspirillum, Acinetobacter, Enterobacter, Klebsiella, Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas, Paenibacillus, Xylophilus, Blastomonas, Sphingomonas, Xanthomonas, Rhizobium</i>	Van Aken <i>et al.</i> , 2004; Porteous <i>et al.</i> , 2002; Doty <i>et al.</i> , 2002
<i>Picea</i> spp. (Fichte)	<i>Bacillus, Pseudomonas, Rahnella, Staphylococcus, Phyllobacterium, unklassifizierte Actinomycetales- Isolate</i>	O'Neill <i>et al.</i> , 1992; Chanway & Holl, 1994; Cankar <i>et al.</i> , 2005
<i>Salix viminalis</i> (Weide)	<i>Sphingomonas, Erwinia, Bacillus, Clavibacter, Curtobacterium, Pseudomonas, Xanthomonas,</i>	Cambours <i>et al.</i> , 2005
<i>Thuja plicata</i> Donn. (Zeder)	<i>Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, Pseudomonas, Arthrobacter, Cellulomonas, Burkholderia, Streptovercillium</i>	Bal & Chanway
<i>Coffea arabica</i> L. (Kaffeestrauch)	<i>Bacillus, Burkholderia, Clavibacter, Curtobacterium, Escherichia, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas, Enterobacter, Klebsiella, Methylobacterium, Rhodococcus, Kocuria, Yersinia, Chromobacterium, Salmonella, Xanthomonas, Acetobacter, Paenibacillus</i>	Vega <i>et al.</i> 2005; Jimenez-Salgado <i>et al.</i> , 1997; Sakiyama <i>et al.</i> , 2001

Die in den verschiedenen Sträuchern, Laubbäumen und Nadelbäumen nachgewiesenen endophytische Bakterien gehören unterschiedlichen bakteriellen Phyla an. Hierzu zählen die gram-negativen *Proteobacteria*, verschiedene Gruppen der *Actinobacteria*, die sporenbildenden *Firmicutes*, aber auch einzelne Vertreter der *Bacteroidetes*. Ein Überblick über die phylogenetische Einordnung der bisher identifizierten Endophyten ist in Abb. 1 dargestellt.

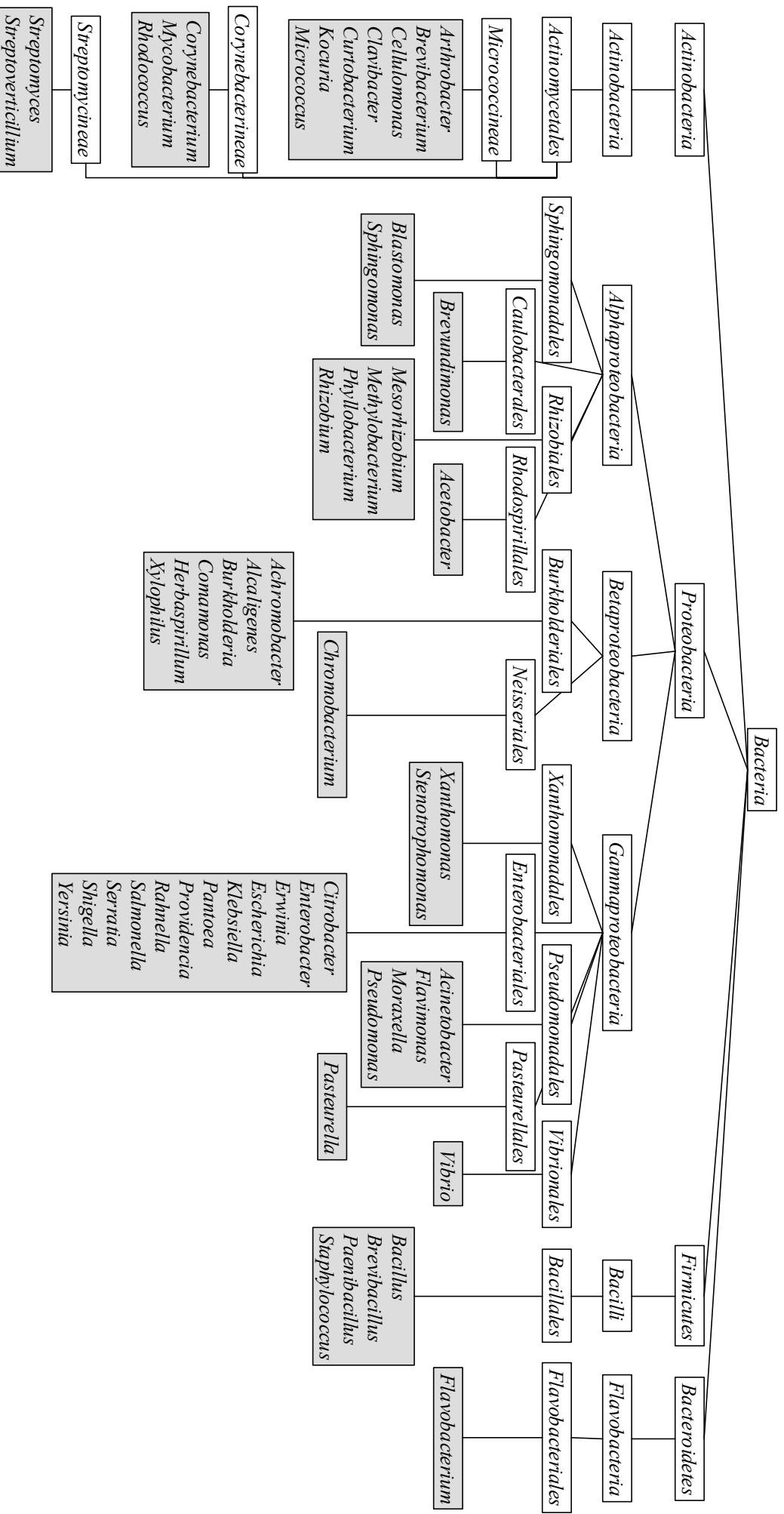


Abb. 1 Überblick über die taxonomische Einordnung der in Forstgehölzen nachgewiesenen endophytischen Bakterien.

#### 5.4. Wirkung endophytischer Bakterien auf ihre Wirtspflanzen

Die Bedeutung der Endophyten bei der biologischen Kontrolle ergibt sich schon daraus, dass sie zum Teil die gleichen Nischen besiedeln wie phytopathogene Pilze und Bakterien und so durch Konkurrenzwirkung („niche exclusion“) die Ausbreitung der Pathogene hemmen oder verhindern (Hallmann *et al.*, 1997b). Antagonistische Wirkungen endophytischer Bakterien auf phytopathogene Pilze und Bakterien wurden vielfach beschrieben (Hebbar *et al.*, 1992, Van Buren *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 2005). Die antagonistischen Effekte beruhen neben der einfachen Konkurrenz auf unterschiedlichen Mechanismen. Durch Bindung der Fe<sup>3+</sup>-Ionen mit Hilfe von Siderophoren verhindern z.B. bestimmte Pseudomonaden die Ausbreitung von Pathogenen durch Erzeugung von Eisenmangel in ihrer unmittelbaren Umgebung (O’Sullivan & O’Gara, 1992). Auch die Produktion von antimikrobiellen Substanzen wie Antibiotika oder HCN oder die Beeinflussung der pflanzlichen Abwehrkraft z.B. durch Induktion von systemischen Resistenzen gehören zu den Kontrollmechanismen der bakteriellen Endophyten (Blumer & Haas, 2000; Bangerla & Thomashow, 1996; Liu *et al.*, 1995; Madhaiyan *et al.*, 2004).

Am intensivsten untersucht ist die direkte Wachstumsförderung durch das Vorhandensein stickstofffixierender, diazotropher Bakterien im Inneren der Pflanze. Obwohl seit der Entdeckung von *Acetobacter diazotrophicus* in Brasilianischem Zuckerrohr Ende der 80er Jahre (Gillis *et al.*, 1989) in verschiedenen anderen Pflanzenarten endophytische diazotrophe Bakterien wie *Herbaspirillum* sp. und *Azospirillum* gefunden wurden, ist noch nicht eindeutig bewiesen, dass diese Bakterien in ihren Wirtspflanzen wirklich Stickstoff fixieren (James & Olivares, 1997). Es ist ebenso möglich, dass die Wachstumsförderung nicht durch die N<sub>2</sub>-Fixierung sondern zum Beispiel durch verbesserte Mineral- oder Wasseraufnahme infolge der Endophytenbesiedlung verursacht wird (Hurek *et al.*, 1994).

Eine direkte Förderung des Pflanzenwachstums kann auch durch die Bildung von Siderophoren oder ähnlicher Mechanismen, die der Pflanze die Aufnahme von Eisen oder anderer Mineralien wie z.B. Phosphor erleichtern (Castignetti & Smarrelli, 1986) oder die Synthese bestimmter niedermolekularer Verbindungen oder Enzyme erfolgen (Lambert & Joos, 1989; Glick *et al.*, 1994). Einige Stämme der Gattungen *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter*, *Methylobacterium* und *Azospirillum* bilden Phytohormone und können dadurch das Wachstum und die Entwicklung ihrer Wirtspflanzen positiv beeinflussen (Bashan & Holguin, 1997; Frommel *et al.*, 1991; Leifert *et al.*, 1994; Holland, 1997).

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss endophytischer Bakterien beziehen sich zum größten Teil auf landwirtschaftliche Nutzpflanzen, aber auch bei Gehölzen gibt es einige Untersuchungen zur wachstumsfördernden und antagonistischen Wirkung bakterieller Endophyten.

1982 konnten Gardner *et al.* bei verschiedenen aus der Xylemflüssigkeit von Zitrus isolierten endophytischen Pseudomonaden sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte auf das Wachstum von Keimlingen nachweisen (Gardner *et al.*, 1982, 1984). Eine reproduzierbare Erhöhung der Biomasse bis zu 36% im Vergleich zu den Kontrollpflanzen erreichten Chanway *et al.* (1994) durch Inokulation von Fichtensetzlingen mit endophytischen Isolaten der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Phyllobacterium* (O'Neill *et al.*, 1992).

Dahm *et al.* (2003) isolierten aus Kiefernurzeln endophytische Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Pasteurella*, die bei Eisenmangel Siderophore produzieren und damit der Pflanze durch die Bereitstellung von Eisen-Ionen einen ökologischen Vorteil verschaffen.

Die biologische Kontrolle von pathogenen Erregern durch endophytische Bakterien scheint auch bei Gehölzen eine bedeutende Rolle zu spielen. Brooks *et al.* (1994) isolierten Endophyten der Gattung *Bacillus* aus der Eiche und konnten ihre antagonistische Wirkung gegen das Eichenwelke-Pathogen *Ceratocystis fagacearum* nachweisen. Aus der Silberbirke wurden *Pseudomonas fluorescens*-Stämme als wirkungsvolles Mittel zur biologischen Kontrolle bei der Aufzucht von Keimlingen isoliert (Björklöf *et al.*, 2002).

Araujo *et al.* (2002) konnten bei Untersuchungen der Diversität endophytischer Bakterien in Zitruspflanzen einen Zusammenhang zwischen der Stärke von Zitrus-Chlorosis (CVC)-Symptomen und dem Auftreten bestimmter Endophyten feststellen. Die in befallenen Pflanzen am häufigsten auftretenden Bakterien gehörten zu den *Methylobacterium*-Arten, was auf mögliche synergistische Effekte zwischen dem *Methylobacterium* und dem CVC-Erreger *Xylella fastidiosa* hinweist. In gesunden Pflanzen dagegen wurde vorrangig *Curtobacterium flaccumfaciens* gefunden, das als biologisches Agens gegen verschiedene Pathogene bekannt ist und auch im Zusammenhang mit der Induzierung systemischer Resistenzen beschrieben wurde (Raupach & Kloepper, 1998). Deshalb wird auch hier von einem Zusammenhang zwischen Endophytenbesiedlung und der Resistenz gegenüber dem CVC-Erreger ausgegangen.



## 5.5. Beeinflussung der Endophyten-Populationen durch exogene Faktoren

Über den Einfluss biotischer oder abiotischer Faktoren auf endophytische Bakterienpopulationen in Pflanzen ist bisher insgesamt nur sehr wenig bekannt. Obwohl sich die endophytischen Bakterien im Inneren der Pflanze in einer geschützten Umgebung befinden, werden sie doch indirekt über die Physiologie der Wirtspflanze durch bestimmte Faktoren wie Temperatur, Wasserhaushalt Nährstoffangebot und UV-Strahlung beeinflusst.

Veränderungen von Endophytenpopulationen in Abhängigkeit vom Standort und der Jahreszeit bzw. der Temperatur konnten bei verschiedenen krautigen Pflanzen nachgewiesen werden (McInroy & Kloepper, 1995; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Pillay & Nowak, 1997).

Jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Gesamt-Endophytenkonzentration im Wurzelxylem von Zitrusbäumen wurden von Gardner *et al.* (1982) beschrieben.

Bei Untersuchungen der Endophytenbesiedlung in der Ulme stellten Mocali *et al.* (2003) einen Einfluss von saisonalen Veränderungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Wassergehalt des Bodens) auf die Zusammensetzung der Bakterienpopulation fest, wobei die Gattungen *Curtobacterium* und *Bacillus* mehr in warmen Monaten und *Pseudomonas* eher im Winter zu finden war. Außerdem konnten in verschiedenen Pflanzenorganen (Wurzel und Stamm) unterschiedliche Populationen gefunden werden.

## 5.6. Endophytische Bakterien in Regenerationssystemen

Endophytische Bakterien sind nicht nur in natürlich wachsenden Pflanzen enthalten, sondern kommen auch in einer Vielzahl von *in vitro* Regenerationssystemen wie Sprosskulturen, Adventivknospenkulturen und embryogenen Linien vor.

*In vitro* Vermehrungssysteme werden für die Erhaltung und vegetative Vermehrung von Zuchtmaterial genutzt und sind eine notwendige Voraussetzung für die Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen. Nach der Definition der pflanzlichen Gewebekultur als Sterilkultur wurden *in vitro* kultivierte Explantate über lange Zeit generell für keimfrei gehalten. Auftretende Kontaminationen und dadurch verursachte Beeinträchtigungen des Pflanzenwachstums, die bis zum Absterben der *in vitro* Kulturen führen können, wurden meist auf Fremdinfectionen durch unzureichend sterile Arbeitstechniken zurückgeführt (Boxus & Terzi, 1987; Singha *et al.*, 1987). Zunehmende Erfahrungen im Umgang mit Vermehrungskulturen verschiedener Pflanzenarten über längere Zeiträume führten jedoch zu der Erkenntnis, dass in vielen Fällen nicht Fremdinfectionen, sondern endophytische Bakterien die Ursache für eine beeinträchtigte Vermehrbarkeit der *in vitro* Explantate sein

können. Die im Gewebe der Pflanzen lebenden endophytischen Bakterien (siehe Abschnitt 5.1.) bleiben durch eine Oberflächendesinfektion unbeeinflusst und werden so über das entsprechende Pflanzenmaterial, das als Ausgangsmaterial für die Etablierung dient, in die *in vitro* Kulturen übertragen. Bakterien, die unter *in vivo* Bedingungen in der Pflanze endophytisch leben, ohne Krankheitssymptome zu verursachen, können sich *in vitro* unter bestimmten Bedingungen so vermehren, dass sie das Pflanzenwachstum stark beeinträchtigen. Kallusphasen in den Regenerationszyklen sowie die Anreicherung der Nährmedien mit organischen Stoffen begünstigen die Entwicklung der endophytischen Bakterien besonders.

Das Vorhandensein endophytischer Bakterien konnte für eine Vielzahl pflanzlicher Zellkulturen bestätigt werden. Zahlreiche Untersuchungen zu diesem Thema an verschiedenen Pflanzenarten sind bei Cassels (1997) und bei Cassels *et al.* (2000) zusammengefasst. Mit der Möglichkeit, Forstpflanzen über den Weg der Regeneration in Gewebekulturen vermehren zu können, rückte das Problem zunehmend auch in das Blickfeld der Forstpflanzenzüchter.

Verschiedene Arbeiten konnten die Anwesenheit von endophytisch lebenden Bakterien in Organkulturen von Koniferen sowie in embryogenen Kulturen nachweisen (Ewald *et al.*, 1997, 2000). Auch in Gewebekulturen von *Pinus sylvestris* L. konnten endophytische Bakterien festgestellt werden (Hohtola, 1988; Pirttilä *et al.*, 2000). Naujoks *et al.*, (2000) beschrieben eine Anreicherung von *Curtobacterium* sp. in Sprosskulturen von Robinie (*Robinia pseudoacacia* L.).

Bei der Untersuchung von meristematischem Blütengewebe von 160 Kiefern in Finnland konnten Pirttilä *et al.* (2000; 2003) durch *in situ* Hybridisierung Bakterien als reguläre endophytische Besiedler des Blütengewebes nachweisen. Die isolierten Bakterien wurden als *Methylobacterium extorquens* und *Pseudomonas synxantha* klassifiziert. Da sowohl die Anzahl als auch die metabolische Aktivität der Blütenendophyten vor dem Wachstum der Blüte zunahm, ging man davon aus, dass die Bakterien einen Einfluss auf das Blütenwachstum haben. Die Untersuchungen ergaben, dass *Methylobacterium extorquens* Adeninderivate produziert, die als Vorstufen der Cytokinin-Biosynthese genutzt werden könnten. Außerdem hatten die Endophyten einen Einfluss auf die Kallus-Morphologie und verzögerten die Bräunung des Kallus, wobei die genauen Ursachen noch nicht bekannt sind (Pirttilä *et al.*, 2004). Ähnlich wie die Ergebnisse von Pirttilä *et al.* (2004) zeigten auch andere Arbeiten, dass *Methylobacterium* durch die Produktion bestimmter Verbindungen wie Vitamin B12 und Cytokinin, die Entfernung von Methanol aus dem wachsenden

Pflanzengewebe und die antagonistische Wirkung gegenüber phytopathogenen Bakterien eine fördernde Wirkung auf die Wirtspflanze haben kann (Basile *et al.*, 1985; Holland, 1997, Holland & Pollacco, 1994; Romanovskaya *et al.*, 2001).

Laukkanen *et al.* (2000) isolierten schnellwachsende, pigmentproduzierende *Mycobacterium* - Stämme aus alternden Gewebekulturen der Kiefer und vermuten, dass die Bakterien, die normalerweise im Boden oder im Wasser vorkommen, über den Xylemsaft in die Blüten gelangen. Sämlinge, die mit *Mycobacterium*- Stämmen inokuliert wurden, wiesen morphologische Veränderungen in Form von verkürzten Hypokotylen und Wurzeln auf.

In *in vitro* Kulturen der Zwergmispel (*Cotoneaster lacteus*) bewirkten endophytische *Pseudomonas*- Stämmen bedingt durch die Produktion von Indol-3-Essigsäure (IAA), eines Phytohormons, das an der Wurzelbildung beteiligt ist, eine verstärkte Bewurzelung der Kulturen (Monier *et al.*, 1998). Döring *et al.* (2005) konnten mit Hilfe des GenomiPhi-Amplifikationssystem endophytische Bakterien in *in vitro* Vermehrungssystemen von *Eleutherococcus sieboldianus* (Sibirischer Ginseng) nachweisen, die sich in den Wurzelhaaren anreichern und dort zu Verzweigungen und Schwellungen führen. Die am häufigsten auftretenden Bakterien waren *Paenibacillus*-, *Alcaligenes*-, *Planomicrobium*- und *Staphylococcus*- Stämme.

Nicht nur in Gewebekulturen von Forstgehölzen konnten endophytische Bakterien gefunden werden, auch in mikrovermehrten Obstgehölzen war deren Nachweis möglich. In *in vitro* Kulturen der Schattenmorelle (*Prunus cerasus*) wurden latent persistierende endophytische Bakterien gefunden und als *Pseudomonas syringae* und *Agrobacterium rhizogenes* identifiziert (Kamoun *et al.*, 1998).

Das Vorkommen endophytischer Bakterien ist in den Gewebekulturen unter üblichen Kultivierungsbedingungen unmittelbar nach der Inkulturnahme optisch oft nicht erkennbar und nur schwer nachweisbar (Ewald *et al.*, 2000; Van Den Houwe & Swennen, 2000; Thomas, 2004). Eine starke Vermehrung bestimmter endophytischer Bakterien tritt im pflanzlichen System in der Gewebekultur meist nur unter spezifischen Bedingungen wie zum Beispiel der Anwesenheit bestimmter Nährstoffe, Nährmedienwechsel oder der Einleitung von Differenzierungsprozessen auf. Oft wird das Auftreten endophytischer Bakterien in Vermehrungssystemen durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika oder durch Kombinationen unterschiedlicher Antibiotika unterdrückt. Antibiotika können eine periodische Bakteriostasis bewirken, die eine starke Ausbreitung der Bakterienpopulation auf ein späteres Stadium der Gewebevermehrung verlagert. Auch für Cytokinine, die als

Wachstumsregulatoren in Vermehrungssystemen eingesetzt werden, wurde eine bakterio-statische Wirkung beschrieben (Boxus & Terzi, 1988; Seyring & Vogt, 1996).

Für verschiedene Bakterienarten muss möglicherweise auch ein Zustand angenommen werden, der als VBNC (viable but nonculturable) beschrieben wird, und eine Kultivierbarkeit erst im Laufe längerer Zeit oder nur auf sehr speziellen Medien möglich wird.

Eine Abhängigkeit der Anreicherung endophytischer Bakterien von den jeweiligen Kultivierungssystemen wurde von Ewald *et al.* (1997, 2000) beschrieben. In Systemen, bei denen die Vermehrung der Explantate lediglich auf einer Sprosssteilung beruhte, jedoch keine Bildung bzw. Absterben von Kallus vorkam, wie z.B. bei der Sprosskultivierung von Lärchen, störten die endophytischen Bakterien in der Regel nicht, bzw. blieben weitestgehend unerkannt (Ewald *et al.*, 2000). In Regenerationssystemen, die auf einer Adventivknospen-induktion, gefolgt von einer Organdifferenzierung basierten, es also zu einer Phase mit absterbendem Kallus kam, reicherten sich die Bakterien stark an. In Systemen, in denen also eine erzwungene Organ- oder Embryodifferenzierung mit höheren Anteilen absterbender Gewebe einhergeht, z.B. bei der Adventivknospenvermehrung von Kiefer und Lärche (Organogenese) oder der somatischen Embryogenese von Fichte und Lärche, vermehrten sich die endophytischen Bakterien im Verlauf von ca. 2 Jahren in einem solchen Maße, dass es teilweise zu einer eingeschränkten Regeneration kam. Es wird angenommen, dass der Kalluszerfall die Ernährungsbasis für die endophytischen Bakterien und die Ursache dafür ist, dass sich die vorher nicht sichtbaren Bakterien plötzlich so stark vermehren, dass sie aus dem Pflanzengewebe heraustreten und sichtbar werden (Ewald *et al.*, 1997; Ewald *et al.*, 2000).

Leifert *et al.* (1989; 1991) wiesen nach, dass sich das Bakterienspektrum nach zwölf-monatiger Kulturzeit im Vergleich zu Explantaten, die nur einem Monat alt waren, bei verschiedenen Kulturarten stark veränderte. Nur wenige Bakterienarten, die nach einem Jahr identifiziert wurden, konnten auch in den Ausgangspflanzen nachgewiesen werden. Die Ursache liegt möglicherweise darin, dass durch spezielle Ernährungsbedingungen oder physiologische Parameter, die in *in vitro* Systemen vorliegen, bestimmte Typen von endophytischen Bakterienpopulationen oder nur einzelne Stämme bevorteilt oder verändert und so zu starkem Wachstum angeregt werden (Leifert *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1998).

Kukkurainen *et al.* (2005) konnten Unterschiede zwischen Bakterienpopulationen in *in vitro* Erdbeeren und Felderdbeeren nachweisen. In den Gewebekulturen waren gramnegative Bakterien in der Überzahl und speziell eine *Pantoea*- Gruppe hatte sich unter *in vitro* Bedingungen besonders stark vermehrt.

Möglicherweise ist das *in vitro* Pflanzengewebe durch die herrschenden luxurierenden Bedingungen auch weniger in der Lage, die Bakterien zu tolerieren bzw. zu beherrschen als die Pflanze *in vivo* (Maes *et al.*, 1998). So können die Bedingungen in *in vitro* Kulturen Pflanzen empfindlich gegenüber bestimmten Bakterien machen (Leifert *et al.*, 1994). Entscheidende Faktoren, die den Eintritt der Bakterien ins Gewebe erleichtern sind unter anderem die dünne Pflanzenepidermis, die schwach entwickelten Stomata und große Wundflächen. Die hohe Luftfeuchtigkeit und das Nährstoffangebot verhindern oft die Ausbildung eines stabilen Abschlussgewebes und die ausreichende Festigkeit der Pflanze. Die sogenannte Vitrifikation (Glasigkeit) ist ein sichtbares Zeichen dafür.

Während Apfelsämlinge und Sprosse zum Beispiel resistent gegenüber *Ralstonia solanacearum*, dem Braunfäuleerreger an Solanaceae sind und nach der Inokulation des Pflanzenmaterials durch einen aktive Abwehrmechanismus gestoppt und abgetötet werden, endet die Infektion von Apfel-Kallusgewebe mit einem extremen Wachstum der Bakterien und dem Absterben der Gewebekultur - die Abwehrreaktion funktioniert also nicht (Maes *et al.*, 1998).

Bei der Verwendung von *in vitro* Kulturen als Ausgangsmaterial für Transformationen muss daher beachtet werden, dass in der transgenen Pflanze unter Stressbedingungen bzw. bei Gewebeerfall eine Vermehrung der endophytischen Bakterien auftreten kann.

## **5.7. Überblick über Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung**

### **5.7.1. Isolation endophytischer Bakterien**

Die Untersuchung bakterieller Gemeinschaften in Pflanzen kann generell in Abhängigkeit vom Isolationsmedium, Unterschieden in Wachstumsbedingungen der Wirtspflanze und der Aufschluss-Methode sehr differierende Ergebnisse bringen.

Bei den endophytischen Bakterien zeigt schon die Definition „...als endophytische Bakterien werden die Bakterien bezeichnet, die aus oberflächensterilisiertem Pflanzengewebe isoliert oder aus dem Inneren von Pflanzen extrahiert werden können...“ (Hallmann *et al.*, 1997b) die Bedeutung der Isolationsmethode für die Ergebnisse der Untersuchung.

Eine Isolation der kompletten Gemeinschaft der endophytischen Bakterien (und dabei *nur* der Endophyten) ist schwer oder kaum zu realisieren. Gründe dafür können neben der Adhäsion der Bakterien an die Pflanzenzellstrukturen vor allem eine unvollständige Oberflächen-desinfektion, oder das Eindringen von Desinfektionslösung in das Pflanzengewebe sein,

wodurch es zum Abtöten endophytischer Bakterien in den äußeren Rindenschichten kommen kann. Die Oberflächendesinfektion stellt daher ein zentrales Problem bei der Endophytenisolation dar und ist immer als Kompromiss zwischen Eliminierung der Oberflächenkontamination und dem Überleben der Endophyten in der Cortex zu sehen (Hallmann *et al.*, 1997b; Kukkurainen *et al.*, 2005).

Die Isolation von endophytischen Bakterien aus Gehölzen ist aufgrund der festen Gewebestruktur besonders schwierig. In den letzten Jahren wurden an verschiedenen Gehölzen die unterschiedlichsten Isolationsmethoden getestet.

**Isolationsmethoden:** In den meisten Fällen werden endophytische Bakterien durch das Zerreiben oder **Mörsern von oberflächen-desinfiziertem Pflanzenmaterial (Homogenisierung)** isoliert. Diese Methode eignet sich für nahezu alle Pflanzengewebetypen, einschließlich Blüten, Früchte und Samen und wird zur Untersuchung des Endophytenpektrums im Gesamtpflanzengewebe angewendet. Als Desinfektionsmittel werden dabei NaOCl, Ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> oder verschiedene Kombinationen dieser Chemikalien verwendet (Hallmann *et al.*, 1997b). Durch die Zugabe von Detergenzien wie Tween 80 oder Triton X-100 kann durch Verminderung der Oberflächenspannung eine bessere Benetzung aller Pflanzenstrukturen erreicht werden. Sowohl die Art als auch die Konzentration des Desinfektionsmittels sollten je nach Verwendungszweck und spezifischer Fragestellung genau getestet und entsprechend der Art, dem Alter und dem verwendeten Teil der Pflanze, optimiert werden. Nach der Oberflächendesinfektion und der Zerkleinerung/Homogenisierung wird das Pflanzengewebe in Pufferlösung oder Flüssigmedium aufgenommen und zum Auszählen und zur Isolation der Bakterien ausplattiert. Negative Effekte durch die Adsorption von Bakterien an Pflanzenteile sind bei dieser Methode (zumindest bei den niedrigen Verdünnungen) gering, da das homogenisierte Gewebe mit ausplattiert wird.

Die Effektivität der angewendeten Desinfektionsmittel kann durch einen Sterilitätstest überprüft werden. Dazu werden zum Beispiel oberflächen-desinfizierte Pflanzenteile auf Bakterien-Nährmedium aufgelegt oder Teile der Waschlösung mit Nährmedium versetzt und bebrütet.

Um die beschriebenen Probleme bei der Oberflächendesinfektion zu umgehen, wurden verschiedene **physikalische Extraktionstechniken** entwickelt: Mit der Vakuumtechnik ist es möglich, Xylemsaft aus den Wurzeln mehrjähriger Pflanzen wie Wein und Zitrus (Bell *et al.*, 1995; Gardner *et al.*, 1982) zu extrahieren, die Scholander-Pressen wurde verwendet, um Wurzelsaft aus Baumwolle zu pressen (Hallmann *et al.*, 1997a). Mit beiden Methoden wird

Pflanzensaft allerdings nur aus dem Leitgewebe und den angrenzenden Interzellularen extrahiert. Vergleichende Untersuchungen der Homogenisierungsmethode und der Extraktion mit der Scholander-Pressen zeigten, dass mit der Presse nur bestimmte Bakterien isoliert werden. Bei Gurken zum Beispiel wurden *Bacillus* spp., eine vorherrschende Bakteriengruppe der Endorhiza, nur mit Hilfe der Homogenisierungstechnik (Mahaffee & Kloepper, 1997) nachgewiesen. Außerdem lieferte die Homogenisierungsmethode, wahrscheinlich durch die Erfassung einer großen Zahl von Nischen im Pflanzengewebe, höhere Endophytenzahlen als die eher selektiven physikalischen Extraktionsmethoden (Hallmann *et al.*, 1997a).

Die dritte Möglichkeit zur Isolation endophytischer Bakterien ist **die Zentrifugation oberflächendesinfizierter Pflanzenteile** bei 3000 g, bei der die Interzellularflüssigkeit aus dem Gewebe extrahiert wird (De Wit & Spikman, 1982). Diese Methode ist jedoch nur für weiches Pflanzengewebe geeignet.

Die Auswahl der Isolationsmethode sollte je nach dem Forschungsziel entschieden werden und wird durch verschiedene Kriterien wie Art und Alter der Pflanze sowie Gewebetyp oder Pflanzenteil, aus dem die Endophytenisolation erfolgen soll, beeinflusst.

### **5.7.2. Nachweis, Quantifizierung und Identifizierung der Endophyten**

Die einfachste und eine sehr unkomplizierte und sensitive Methode zum Monitoring von endophytischen Bakterienpopulationen ist die Kultivierung der isolierten Bakterien auf verschiedenen Nährmedien. Die Populationsdichte kann durch Auszählen der Bakterienkolonien auf einem geeigneten Medium ermittelt werden, wobei hier jedoch nur die lebensfähigen Bakterien berücksichtigt werden, die zum Wachstum auf den entsprechenden Medien fähig sind. Durch Vitalfärbung mit Acridin Orange können unter dem Lichtmikroskop Bakterien im Pflanzengewebe dargestellt und die Gesamtzahl der Endophyten einschließlich der nichtkultivierbaren Zellen in extrahiertem Pflanzengewebe bestimmt werden (Bell *et al.*, 1995).

Für die Lokalisierung der endophytischen Bakterien im Pflanzengewebe sind ebenso elektronenmikroskopische Methoden, Immunofluoreszenz-Techniken (Levanony *et al.*, 1989; Van Vuurde & Roozen, 1990) oder auch die *in situ* Hybridisierung (Mc Fadden, 1991) geeignet.

Zur Identifizierung der isolierten endophytischen Bakterien steht ein breites Methodenspektrum von klassischen mikrobiologischen Untersuchungen über immunologische und biochemische Methoden bis zu molekulargenetischen Methoden zur Verfügung. Hierbei werden sowohl die Fettsäuremethylester-Technik (FAME-GC-Analyse), die eine Bestimmung

der Bakterien anhand ihres Fettsäurespektrums erlaubt (Sasser, 1990), als auch die Analyse der 16S rRNA Gene (Woese, 1987) verwendet. Auf Basis beider Methoden können die isolierten Endophyten sicher bis auf Gattungsebene und zum Teil bis auf Artebene phylogenetisch eingeordnet bzw. taxonomisch bestimmt werden (Tabelle 3). Bei einer großen Anzahl von Isolaten kann bei der genetischen Analyse zunächst eine Gruppierung über eine Restriktionsanalyse der amplifizierten 16S rDNA (ARDRA) durchgeführt werden. Die Bestimmung erfolgt jedoch über die Sequenzierung eines Teils oder der vollständigen 16S rDNA.

Neben den kulturabhängigen Methoden, die vom physiologischen Status der Bakterien abhängig sind und nur die Endophyten berücksichtigen, die auf den vorgegebenen Nährmedien kultivierbar sind, wurden in den letzten Jahren vermehrt kulturunabhängige Methoden eingesetzt. Der Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass auch Bakterien, die zwar lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind (VBNC, viable but nonculturable), miterfasst werden. Durch Amplifikation der bakteriellen 16S rDNA aus Gesamt-DNA, die direkt aus dem Pflanzengewebe gewonnen wurde, können Schwierigkeiten, die bei klassischen Isolationsmethoden auftreten, überwunden werden. Hierbei werden die amplifizierte DNA kloniert und die 16S rDNA-Fragmente der einzelnen Klone durch Sequenzierung identifiziert. Nach der Isolation der Gesamt-DNA der Pflanze oder von Pflanzenteilen wie Wurzel, Spross, Blätter oder Gefäßflüssigkeit wird bei der PCR mit konservierten Primern für das bakterielle 16S rRNA Gen auch die DNA der pflanzlichen Chloroplasten und Mitochondrien erfasst. Durch Verwendung von spezifischen 16S rDNA-Primern (799f) wird ein breites Spektrum von Bakterien amplifiziert, die Amplifikation von cpDNA jedoch ausgeschlossen. Die ebenfalls im Pflanzenmaterial vorhandene mtDNA ist durch ein deutlich größeres PCR-Produkt vom bakteriellen Amplifikat deutlich zu unterscheiden (Chelius & Triplet, 2001). Nach Klonierung des bakteriellen PCR-Produkts und Sequenzierung der klonierten Fragmente können die einzelnen endophytischen Bakterien ermittelt werden.

Bei Untersuchungen an Mais wurden nur 48% der Endophyten gleichermaßen über Kultivierung und über die kulturunabhängige Analyse gefunden (Chelius & Triplet, 2001). Alle anderen identifizierten Arten konnten lediglich mit einer der beiden Methoden nachgewiesen werden, wobei die kulturunabhängige Analyse eine größere phylogenetische Diversität lieferte. Um die Komplexität der Endophytengemeinschaft möglichst vollständig zu erfassen, ist es deshalb sinnvoll, beide Ansätze miteinander zu kombinieren.



Die Analyse der Endophytengemeinschaft über die Sequenzierung einzelner Klone wurde bei Forstgehölzen bisher bei der Fichte durchgeführt. Hierbei konnten Endophyten auch in Fichtensamen nachgewiesen werden (Cankar *et al.*, 2005).

Obwohl durch die Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA die Zusammensetzung der Endophytengemeinschaften detailliert ermittelt werden kann, ist diese Methoden bei großem Probenumfang oft zu zeit- und arbeitsaufwendig. Fingerprinttechniken wie die T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism; Liu *et al.*, 1997) und die DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis; Muyzer *et al.*, 1993) erlauben hingegen eine schnelle Analyse der Endophytengemeinschaft in einem großen Probenet. Hierbei werden die dominanten Bakteriengruppen in ihrem relativen Verhältnis dargestellt. Angewendet wurde diese Technik z.B. für die Differenzierung und Klassifizierung der Endophytengemeinschaften unterschiedlicher Kartoffelsorten und -linien (Reiter *et al.*, 2002, Berg *et al.*, 2005, Garbeva *et al.*, 2001). Araujo *et al.* (2002) untersuchten die Diversität von endophytischen Bakteriengemeinschaften von Zitrusbäumen über die DGGE.

Neben der phylogenetischen Analyse der Gemeinschaften ist es über die Fingerprinttechniken auch möglich, Bakterien mit besonderen Eigenschaften, wie die stickstofffixierenden Bakterien (über die *nif*-Gene), oder die am Abbau organischer Schadstoffe beteiligten Bakterien in ihrer Diversität zu charakterisieren (Lodewyckx *et al.*, 2002; Knauth *et al.*, 2005).

Ein Überblick über die bisher bei der Isolation und Charakterisierung der Endophyten verwendeten Methoden ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Methoden zur Isolation und Identifizierung endophytischer Bakterien aus Gehölzen

Pflanzentyp	Endophyten-Isolation	Identifikations-Methoden
<i>Citrus</i> spp. (Zitrus) (Araujo <i>et al.</i> , 2001)	Oberflächendesinfektion der Blätter und Samen mit 70% Ethanol, 3% NaOCl (3min), 70% Ethanol, W+ST, Homogenisierung in 0,85% NaCl, Gewinnung von Isolaten auf TSA	Morphologische Charakterisierung, CFU, RAPD-Analyse der Isolate
<i>Citrus</i> spp. (Araujo <i>et al.</i> , 2002)	Oberflächendesinfektion von Zweigsegmenten mit 70% Ethanol, 2% NaOCl (5min), 70% Ethanol, W+ST, Entfernung der Rinde, Gewinnung von Isolaten auf TSA Gesamt-DNA aus sterilen Zweigteilen	Morphologische Charakterisierung, FAME, 16S rDNA- Sequenzierung der Isolate, DGGE
<i>Vitis vinifera</i> (Wein) (Bell <i>et al.</i> , 1995)	Sterile Vakuum-Xylem-Extraktion, Homogenisierung und Gewinnung von Isolaten auf TSA	CFU, BIOLOG, Gramfärbung, Acridin Orange-Färbung

<i>Ulmus</i> spp. (Ulme) (Mocali <i>et al.</i> , 2003)	Oberflächendesinfektion von Sproß- und Wurzelteilen mit 1% NaOCl (2 min), W+ST, Entfernung der Rinde, Herauspräparieren des Phloemgewebes, Mörsern in 0,8% NaCl, Gewinnung von Isolaten auf NSA	ARDRA und Sequenzierung der 16S rDNA der Isolate
<i>Ulmus</i> spp. (Mengoni <i>et al.</i> , 2003)	Isolation von Phloem-Gewebe aus Wurzeln und Zweigen nach Mocali <i>et al.</i> (2003)	ARDRA und Sequenzierung der 16S rDNA der Isolate
<i>Pinus contorta</i> (Kiefer), <i>Thuja plicata</i> (Zeder) (Bal & Chanway)	Präparation von Bohrkernen aus dem Stamm mit sterilem Bohrer, Oberflächendesinfektion mit 2,5% NaOCl (2 min), W+S, Homogenisierung, Gewinnung von Isolaten auf TSA und CCM	Morphologische Charakterisierung, FAME, Acetylen Reduktions-Test
<i>Pinus sylvestris</i> (L.) (Kiefer) (Pirttilä <i>et al.</i> , 2000)	Oberflächendesinfektion von Blüten mit 70% Ethanol, 6% CaCl <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20 min), W+S, steriles Zerteilen, Gewinnung von Isolaten auf MS	16S rDNA- Sequenzierung der Isolate, 16S rRNA <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>Populus</i> (Pappel) (Germaine <i>et al.</i> , 2004)	Oberflächendesinfektion von Zweigsegmenten mit 1% NaOCl (5 min) Extraktion von Xylem-Saft mit Scholander-Presse, Gewinnung von Isolaten	16S rDNA- Sequenzierung
<i>Salix viminalis</i> (Weide) (Cambours <i>et al.</i> , 2005)	Desinfizieren von Zweigsegmenten mit 70% Ethanol (Spray), W+ST, Entfernen der Rinde, Aufnehmen der Gewebeteile in neutraler Pufferlösung und 20 min Inkubation, Gewinnung von Isolaten auf TSA	Morphologische Charakterisierung, Gramfärbung, BIOLOG, Biochemische Tests, 16S rDNA- Sequenzierung
<i>Coffea arabica</i> (Kaffeestrauch) (Vega <i>et al.</i> , 2005)	Oberflächendesinfektion von Beeren-, Stamm-, Blatt- Wurzel- und Samen-Proben mit 0,52% NaOCl (2 min) und 70% Ethanol, W+ST, Gewinnung von Isolaten auf YMA	Morphologische Charakterisierung, Biochemische Tests, FAME
<i>Picea abies</i> L. Karst (Fichte) (Cankar <i>et al.</i> , 2005)	Oberflächendesinfektion von Samen mit 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 min), W+ST, ca. 15 h in sterilem H <sub>2</sub> O stehen lassen, sterile Präparation von Samenschale, Endosperm und Embryo, Anreicherung in flüssigem BHI, Gewinnung von Isolaten auf BHI Gesamt-DNA aus sterilen Samenteilchen	Gramfärbung, Biochemische Tests, Klonierung der direkt amplifizierten 16S rDNA (RFLP-Analyse und Sequenzierung)
Isolation von endophytischen Bakterien aus <i>in vitro</i> Kulturen		
<i>Populus</i> (Pappel) (Van Aken <i>et al.</i> , 2004)	Bakterienisolation aus oberflächendesinfizierten Explantaten, aus Gewebekulturen und aus regenerierten Pflanzen durch Ausstreichen auf LB-Medium Gesamt-DNA aus Pappel-Explantaten	Morphologische Charakterisierung, Biochemische Tests, 16S rDNA- Sequenzierung der Isolate, PCR-Nachweis von <i>Methylobacterium</i>
<i>Prunus cerasus</i> (Schattenmorelle) (Kamoun <i>et al.</i> , 1998)	Zermörsern von <i>in vitro</i> Pflanzen in Pufferlösung, Gewinnung von Isolaten auf YMA (mit oder ohne vorherige Anreicherung in Flüssigmedium) Gesamt-DNA aus Explantaten	Morphologische Charakterisierung, PCR-Nachweis spezifischer Endophyten

**Verwendete Abkürzungen:** W+ST - Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O bzw. Puffer und Steriltest durch Auflegen von desinfizierten Pflanzenteile auf Bakterienmedium oder Ausplattieren des Waschwassers; CFU – Bestimmung der Populationsdichte (colony forming units); ARDRA - Amplified rDNA Restriction Analysis; YMA - Yeast Malt Agar; NSA - Nähragar +5% Saccharose; TSA - Tryptic Soy Agar; CCM - Combined Carbon Medium (zur Selektion von N<sub>2</sub>-fixierenden Bakterien); BHI - Brain Heart Infusion Medium; MS – Medium nach Murashige & Skoog (1962)

## **6. Persistenz von Agrobakterien in transgenen Kulturen und Überblick über die Nachweismethoden**

### **6.1. Persistenz**

Agrobakterien werden routinemäßig als Transformationsvektoren genutzt, um fremde Gene in Pflanzengenome einzuschleusen. *Agrobacterium* ist ein phytopathogenes Bakterium, das ein großes Spektrum an Wirtspflanzen infizieren kann (De Cleene & De Ley, 1976). Während die von den Bakterien induzierten Tumore an der Pflanze die optimalen Lebensbedingungen für die Agrobakterien bieten, wurden auch außerhalb der Tumore und sogar in symptomlosen Pflanzen Agrobakterien nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Gewebetypen (Gefäßsystem, Rindengewebe) und *in vitro* vermehrten Kulturen von *Vitis vinifera* (Weinrebe) Agrobakterien latent persistieren und sich systemisch ausbreiten ohne sichtbare Symptome zu verursachen (Lehoczky, 1968; Jäger *et al.*, 1990; Poppenberger *et al.*, 2002). Auch in *Rosa* sp. und *Rubus* sp. wurden latente Infektionen durch Agrobakterien beschrieben (Bouzar *et al.*, 1995; Pionnat *et al.*, 1999; Marti *et al.*, 1999). Der Nachweis nichtpathogener Agrobakterien in Rapssamen (Weller *et al.*, 2002) deutet auf ein Risiko der Verbreitung der Bakterien durch adulte Pflanzen hin. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Agrobakterien generell in der Lage sind, in verschiedenen Organen der Pflanze zu persistieren, sich innerhalb der Pflanze zu bewegen und außerdem in unterschiedlichen Lebensräumen zu überleben.

Um nach erfolgter Genübertragung ins pflanzliche Genom mit Hilfe der binären Vektoren die Agrobakterien aus den infizierten Pflanzenexplantaten zu entfernen, findet die Regeneration auf einem Antibiotika-haltigen Medium statt. Weil die derzeit verwendeten Antibiotika eher bakteriostatisch als bakteriozid wirken, verhindert die Selektion zwar die Vermehrung der Bakterien, tötet sie aber nicht vollständig ab (Leifert, 2000; Leifert & Cassells, 2001; Cubero & Lopez, 2004). Besonders gram-negative Bakterien, zu denen auch *Agrobacterium tumefaciens* gehört, sind aus *in vitro* Pflanzenkulturen sehr schwer zu entfernen (Leifert *et al.*, 1991). Hierdurch kann es zu einer Persistenz der Agrobakterien in den transgenen Pflanzen

kommen. Die transgene DNA liegt so nicht nur im Genom der transgenen Pflanzen vor, sondern ist auch in den im Pflanzengewebe persistierenden Agrobakterien vorhanden.

In Abhängigkeit vom Wirtsspektrum des Plasmids, das für die Transformation genutzt wurde, ist sowohl eine Übertragung der Gene auf die in der Pflanze lebenden endophytischen Bakterien als auch auf die Rhizosphärenbakterien möglich. Die Wahrscheinlichkeit des Gentransfers steigt, wenn die Agrobakterien, wie bei Tabak und anderen Pflanzen gezeigt wurde (Matzk, 1998), über längere Zeit in der transgenen Pflanze persistieren.

Zur Persistenz gentechnisch veränderter Agrobakterien gibt es bisher relativ wenige Untersuchungen. Anfänglich wurde die Persistenz anhand des Austretens von Agrobakterien aus dem Nährmedium an der Schnittstelle der Sprosskultur beurteilt (Graser, 1994; Landsmann *et al.*, 1995). Auch ging man oft von Keimfreiheit aus, wenn nach der Überführung der transgenen Pflanzen auf antibiotikafreies Medium keine Agrobakterien auswuchsen (Barghchi *et al.*, 1994). Cooke *et al.* (1992) beschrieben, dass *A. tumefaciens* in *in vitro* Pflanzen latent persistieren kann, ohne aus dem Gewebe herauszuwachsen und auf dem Medium sichtbar zu werden und ohne Symptome an der Pflanze zu verursachen.

In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Beseitigung der Agrobakterien- Vectorsysteme nach erfolgter Transformation sehr schwierig ist und die lange Persistenz der Bakterien in der transgenen Pflanze ein großes Problem für die Gentechnik darstellt.

Van der Hoeven *et al.* (1991) isolierten von ausgewachsenen Tabakpflanzen viele Monate nach der Transformation funktionell intakte Bakterien und zeigten, dass durch Cefotaxim-Behandlung zwar das Auftreten von sichtbaren Symptomen verhindert wird, eine Eradikation des Bakteriums jedoch nicht erreicht wird.

In Extrakten von transgenen Tomaten, Avocado und Grapefruit, die mit Hilfe eines *Agrobacterium*- Vectors mit einer cDNA des Citrus exocortis viroids (CEVd) transformiert worden waren, fanden Mogilner *et al.* (1993) 38 bis 90 Tage nach der Transformation mit CEVd-Primern (Gross *et al.*, 1982) große Mengen von persistierenden Agrobakterien.

Matzk *et al.* (1996) konnten Agrobakterien in transgenen Tabak- *in vitro* Sproßkulturen 12 Monate nach der Transformation und erfolgter Standard-Antibiotika-Behandlung mit alternierender Anwendung von Cefotaxim und Carbenicillin und weitere 6 Monate danach in *ex vitro* Bodenkulturen nachweisen. Die Bakterien überlebten nicht nur, sondern vermehrten sich und breiteten sich in der transgenen Wirtspflanze systemisch aus, wobei der Hauptanteil der Bakterien an der Stengelbasis und in der Wurzel konzentriert war.

Barrett *et al.* (1997) fanden persistierende *Agrobacterium*- Stämme mit binären Vektoren in transformierten Kulturen von *Solanum*, *Brassica* und *Rubus* und konnten in transgenen Kartoffelpflanzen ein Ansteigen der Bakterienpopulation 12-16 Wochen nach der Transformation beobachten.

Bei Untersuchungen zur Persistenz von Agrobakterien in transgenen insektenresistenten Pappeln chinesischer Herkunft wurden Bakterien isoliert, bei denen zum Teil die Resistenzgene *BtCryIAC* und *API* über PCR nachgewiesen werden konnten (Ewald *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten in 3 von 28 transgenen Pappelklonen ca. ein Jahr nach erfolgter Transformation persistierende Agrobakterien durch den PCR-Nachweis der Gene *virG* (Helferplasmid), *chvE* (chromosomal) sowie *BtCryIAC*, *API* und *nptIII* (T-DNA) festgestellt werden (Yang, pers. Mitteilung).

Studien zur Transformation von Zitruspflanzen zeigten, dass trotz Selektion durch Vancomycin und Cefotaxim Agrobakterien über eine Zeit von 12 Monaten nach der Ko-Kultivierung im Pflanzengewebe persistieren können und durch die Expression des Kanamycin-Resistenzgens der rekombinanten Agrobakterien (pBin19-Derivate) die Selektion von transformierten Zellen erschwert wird (Dominguez *et al.*, 2004).

Um eine Übertragung von Transgenen durch persistierende Agrobakterien nach Pflanzen-Transformationen zu vermeiden, ist eine weitestgehende Reduktion der Agrobakterien wünschenswert. Weil durch die Antibiotika-Behandlung in vielen Fällen keine komplette Abtötung der Bakterien erreicht wird, sollte nach erfolgter Transformation und Regeneration ein Nachweis der „Agrobakterien-Freiheit“ auch unter Verwendung von kulturunabhängigen Analysen erfolgen, um die Agrobakterien unabhängig von ihrem physiologischen Zustand zu erfassen (Cubero & Lopez, 2004).

## **6.2. Nachweismethoden**

Obwohl der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer seit vielen Jahren routinemäßig für die Transformation höherer Pflanzen angewendet wird und transgene Pflanzen zum Teil schon der kommerziellen Nutzung zur Verfügung stehen, wurde dem Nachweis persistierender Agrobakterien in transformierten Pflanzen bisher wenig Beachtung geschenkt.

Rekombinante Agrobakterien können jedoch trotz Antibiotika-Behandlung sowohl in *in vitro* als auch *ex vitro* Pflanzen lange Zeit persistieren, sich in ihrer Wirtspflanze vermehren und systemisch ausbreiten (Matzk *et al.*, 1996; Barrett *et al.*, 1997).

Um das Risiko der Übertragung von Transgenen durch persistierende, rekombinante Agrobakterien nach Pflanzen-Transformationen zu vermeiden, sollten in den zur Freisetzung kommenden Pflanzen keine transgenen Agrobakterien mehr vorhanden sein. Der Nachweis der Agrobakterien erfordert sehr sensitive Methoden, die die Bakterien unabhängig von ihrem physiologischen Zustand erfassen (Cubero & Lopez, 2004; Matzk *et al.*, 1996).

Generell lassen sich bei den Nachweis- und Identifikationsmethoden für Agrobakterien in transgenen Pflanzen zwei Gruppen unterscheiden: Kulturabhängige Methoden, die auf dem Vorhandensein sichtbarer und kultivierbarer Bakterien beruhen und kulturunabhängige Methoden, mit denen Bakterien unabhängig von ihrem physiologischen Zustand nachgewiesen werden können.

Der Vorteil der kulturabhängigen Methoden liegt in ihrer Einfachheit und in der Garantie, nur lebende Zellen nachzuweisen, die besonders für die Beurteilung ökologischer Risiken von Bedeutung sind. Zur Erhöhung der Sensitivität dieser Techniken können zusätzliche Anreicherungsschritte durchgeführt werden.

Kulturunabhängige Methoden basieren vorrangig auf PCR-Techniken und sind deshalb sehr sensitiv. Der Vorteil dieser Methoden besteht darin, dass auch Bakterien, die zwar lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind (VBNC, viable but nonculturable), miterfasst werden. Dieser Zustand, der für verschiedene Bakteriengattungen einschließlich *Agrobacterium* beschrieben wurde (Manahan & Steck, 1997), ist reversibel und kann durch Änderung der Wachstumsbedingungen aufgehoben werden (Whitesides & Oliver, 1997). Weil der VBNC-Zustand vorrangig durch Stress hervorgerufen wird (Alexander *et al.*, 1999), ist es möglich, dass Agrobakterien in transformiertem Gewebe in diesen Status verfallen (Cubero & Lopez, 2004).

### **6.2.1. Anreicherungskulturen**

Als Kultivierungsmethode für den Nachweis der Agrobakterien hat sich die selektive Anreicherung aus gemörsertem Pflanzenmaterial besonders bewährt. Durch die Homogenisierung werden auch die Agrobakterien, die in den inneren Gewebekompartimenten der Pflanze persistieren, freigelegt.

Methoden, die auf Kultivierungsmethoden beruhen, haben den Vorteil, dass selektive Resistenzmarker angewendet werden können. So kann die chromosomale Rifampicin-Resistenz von *Agrobacterium tumefaciens* für einen selektiven Anreicherungsschritt bei der Isolation persistierender Agrobakterien aus Pflanzenmaterial genutzt werden.

Die Bakterien, die nach der selektiven Kultivierung erhalten werden, können mit Hilfe von mikrobiologischen und molekulargenetischen Standardmethoden, biochemischen Tests oder auch immunologischen Methoden weiter identifiziert werden.

Bei Anreicherungskulturen aus unsterilem Pflanzengewebe (*ex vitro*) wie Freiland- oder Gewächshauspflanzen, muss neben einer hohen Sensitivität auch eine hohe Selektivität gewährleistet sein. Während die Agrobakterien angereichert werden sollen, müssen natürlich vorkommende Mikroorganismen, vor allem endophytische und epiphytische Pilze, in ihrem Wachstum gehemmt werden. Da die gesuchten Agrobakterien oft eine chromosomale Rif-Resistenz besitzen, kann man zur Hemmung der unerwünschten Mikroorganismen Rifampicin und Cycloheximid (als Zytotoxin für Eukaryonten) anwenden (Matzk, 1998).

### **6.2.2. Mikrobiologische, biochemische und immunologische Methoden**

Beim **Selektiven Plattieren (Antibiotika-Resistenzspektrum)** werden je nach den zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*- Stämmen Einzelkolonien (nach Anreicherung) auf Bakterienmedium mit den Antibiotika ausgestrichen, die die Resistenzgene auf dem Chromosom, dem Helferplasmid oder dem binären Vektor ansprechen.

Mit Hilfe des **Ketolactosetest (KLT)** nach Bernaerts & De Ley (1963) können spezifisch *A. tumefaciens*- Stämme nachgewiesen werden. Nach Anzucht auf  $\alpha$ -Lactose-Agar bildet sich um *A. tumefaciens*- Kolonien bei Überschichten mit Benedict's Reagenz durch Reduktion des  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{Cu}_2\text{O}$  innerhalb einer Stunde ein gelber Ring, andere *Agrobacterium*-Arten und andere Bakterien zeigen keine Reaktion.

Im **Eskulin-Verwertungs-Test** (Wachstum auf Gallensalz-Eskulin-Agar) bilden Eskulin-verwertende Bakterien wie *A. tumefaciens*, nach ein bis zwei Tagen dunkelbraun/schwarze Kolonien.

Beim **Urease-Nachweis** sind Bakterien, die mit Hilfe von Urease Harnstoff in  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  spalten, wie *A. tumefaciens*, auf Ureaseagar nach ein bis zwei Tagen an pinkfarbenen, stark diffundierenden Höfen erkennbar.

Neben den mikrobiologischen und biochemischen Methoden wurde auch eine **immunologische Identifizierung** der *Agrobacterium*-Stämme unter Verwendung des Slide agglutination- Tests nach Lyons & Taylor (1990) bzw. durch Immuno-dot blot beschrieben (Matzk, 1998)

### 6.2.3. Molekulare Identifizierungsmethoden

Durch die Amplifikation *Agrobacterium*-spezifischer DNA-Sequenzen kann *A. tumefaciens* ohne vorherige Anreicherung direkt nach einem DNA-Extraktionsschritt im Pflanzengewebe nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Agrobakterien in *in vitro* Regenerationssystemen ist ein zusätzlicher genereller Amplifikationsschritt mit dem GenomiPhi-System möglich. Dieser Schritt kann von Vorteil sein, wenn die zu analysierende Probe nur wenig DNA enthält (Döring *et al.*, 2005). Außerdem kann der PCR-Nachweis zur Identifizierung von isolierten Agrobakterien (indirekter Nachweis nach zusätzlichem Anreicherungsschritt) eingesetzt werden. Während mit Anreicherungskulturen nur ein Nachweis kultivierbarer Agrobakterien möglich ist, lassen PCR-Methoden auch Aussagen über nicht kultivierbare oder abgestorbene Bakterien und auch über freie DNA-Sequenzen zu.

Zum Nachweis pathogener *Agrobacterium*-Stämme eignen sich universelle Primer, die auf Sequenzen der hoch konservierten *vir*-Operons (*virG*, *virC*, *virD*) beruhen (Chen *et al.*, 1991; White & Nester, 1980; Sawada *et al.*, 1995; Haas *et al.*, 1995; Hamill *et al.*, 1991). Auch können Primer mit Homologien zu bestimmten T-DNA-Genen (*tms*, *tmr*, *ipt*) verwendet werden (Dong *et al.*, 1992; Pionnat *et al.*, 1999; Haas *et al.*, 1995).

Zum Nachweis von rekombinanten Agrobakterien sind jedoch Primer notwendig, die auf chromosomale *Agrobacterium*-Sequenzen, Gene der Helferplasmide (*vir*) oder auf spezifische Sequenzen der binären Vektoren ansprechen.

Matzk (1998) verwendeten zum Nachweis persistierender transgener Agrobakterien in *in vitro* Kartoffelpflanzen verschiedene Primerpaare, um unterschiedliche Teile des Agrobakteriengenoms abzudecken. Ausgewählt wurden Primer für das chromosomale *ros*-Gen (Cooley *et al.*, 1991), für das *virG*-Gen (Chen *et al.*, 1991) auf dem Helferplasmid und eine stammspezifische Sequenz auf der T-DNA (Zweigerdt, 1993). Ergeben nur die spezifischen Primer für die T-DNA Signale, kann man vom Einbau der T-DNA und damit des entsprechenden Fremdgens in das Pflanzengenom ausgehen, positive Signale für alle drei Primerpaare sind jedoch ein Hinweis auf die Existenz intakter Agrobakterien.

Die Eignung der beschriebenen Primerpaare zum direkten Nachweis von *A. tumefaciens* in *in vitro* kultivierten Pflanzen wurde von Zweigerdt (1993) getestet, die Nachweisgrenze für Agrobakterien für diese Methode lag bei ca. 100 eingesetzten Bakterien pro PCR-Reaktion. Zum Nachweis von *A. tumefaciens*-Sequenzen in Freilandpflanzen ist die Methode nicht angebracht, weil natürlich vorkommende Agrobakterien sowohl bei den Primern für das *ros*- als auch bei denen für das *vir*-Gen mit amplifiziert werden und die PCR-Reaktionen



außerdem zum Teil durch Huminsäuren in anhaftender Erde gestört werden (Matzk, 1998). Für die Nutzung der PCR zum direkten Nachweis von *Agrobacterium*- Laborstämmen im Freiland müssten Primer verwendet werden, die im Bereich der „Overdrive-Sequenzen“ (Bereich des binären Vektors vor dem RB der T-DNA) und innerhalb der T-DNA binden. Dieser Bereich bietet sich an, da bei Integration der T-DNA ins Pflanzengenom oft am RB korrekt geschnitten wird. Durch dieses Primerpaar wird ein PCR-Produkt gebildet, das bei Vorhandensein des Vektors (in den rekombinanten Agrobakterien), nicht aber in natürlich vorkommenden Agrobakterien bzw. nach Insertion der T-DNA ins Pflanzengenom nachweisbar ist.

Auf diese Weise würde die Zahl der falsch-positiven Signale reduziert werden, die nicht von nachgewiesenen Agrobakterien, sondern von Pflanzen stammen, die Bereiche außerhalb des LB integriert haben (Matzk, 1998). Die Eignung dieser Sequenzen zum spezifischen Nachweis der Agrobakterien ist letztendlich von der konkreten Insertion der T-DNA ins Pflanzengenom abhängig.

Zur Identifizierung isolierter Bakterien (nach Anreicherung aus dem Gewebe transgener Pflanzen) eigneten sich Primer, die die eingebauten Fremdgene auf der T-DNA nachweisen. Um natürlich vorkommende Sequenzen von denen transgener Agrobakterien abzugrenzen, wurde ein Primer innerhalb der codierenden Sequenz des *pat*-Gens (vermittelt eine Resistenz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium) und ein Primer in der Promotorregion (CaMV 35S) des Konstrukts gewählt (35S/*pat*) (Matzk, 1998).

Zum Nachweis von persistierenden Agrobakterien nach einem Anreicherungsschritt aus *ex vitro* Pflanzen wurde eine dot-blot-Hybridisierung durchgeführt. Als Sonde für das dot-blot-Screening wurde das auf der T-DNA des Vektors pOCA18/Ac lokalisierte *pat*-Gen verwendet. Um positive Ergebnisse, die durch unspezifische Signale entstanden waren, auszuschließen, wurde ein PCR-Screening aller dot-blot positiven Stämme mit Primern für die 35S/*pat*- Region durchgeführt. Positive Ergebnisse zeigten damit eindeutig die gentechnisch veränderten Agrobakterien an.

Die PCR-Analyse mit spezifischen Primern für das auf dem Helferplasmid lokalisierte *virD1*-Gen von *A. tumefaciens* wurde zum Nachweis persistierender *Agrobacterium*- Vektoren in *in vitro* Pflanzen nach Transformationen von *Casuarina glauca* (Smouni *et al.*, 2002), *Ulmus procera* (Gartland *et al.*, 2001) und *Allocasuarina verticillata* (Franche *et al.*, 1997) angewendet.

Dominguez *et al.* (2004) untersuchten die Persistenz von *Agrobacterium* in transformierten Zitrus-Explantaten nach Anreicherung auf einem Selektivmedium durch Amplifikation mit *gusA*- und *sgfp*- Primern, die für das auf dem binären Vektor integrierte  $\beta$ -Glucuronidase- bzw. „synthetic green fluorescent protein“ kodieren, und mit Primern für die *vir* Region (FGP *virB*<sub>11+21</sub> und FGP *virG*15') (Cubero *et al.*, 1999).

Generell ist der Agrobakteriennachweis durch PCR-Methoden umfassender als der kulturabhängige Test, weil durch die PCR ein Nachweis unabhängig vom physiologischen Zustand der Bakterien erfolgt. Der beste Weg zu einem sicheren Nachweis der Agrobakterien und damit zur Herstellung und Vermehrung agrobakterienfreier transgener Pflanzen ist jedoch die Kombination aus kulturabhängigen und kulturunabhängigen Methoden.

## **7. Mechanismen des DNA-Transfers bei Bakterien mit besonderem Bezug auf *Agrobacterium***

Bakterien sind in der Lage, im Rahmen des horizontalen Gentransfers DNA aus der Umwelt aufzunehmen und über zum Teil weite phylogenetische Distanzen untereinander auszutauschen (Sorensen *et al.*, 2005). Das Verständnis der Mechanismen des horizontalen Gentransfers, der über Konjugation, Transduktion und Transformation erfolgen kann, vermittelt eine Vorstellung über die Möglichkeiten und Grenzen der Übertragung genetischer Informationen innerhalb der Bakterien. In der Studie wird im folgenden auf die bakterielle Konjugation und die Transformation anhand gut untersuchter Systeme eingegangen. Dabei sollen sowohl prinzipielle Grundlagen als auch Gemeinsamkeiten und Besonderheiten verschiedener Systeme dargestellt werden. Basierend auf den Eigenschaften der für die Pflanzentransformation verwendeten binären Vektoren und den Kenntnissen zur Diversität endophytischer Bakterien in Forstgehölzen können theoretische Möglichkeiten der Übertragung rekombinanter DNA auf Endophyten im Pflanzengewebe aufgezeigt werden.

### **7.1. Konjugation**

Die bakterielle Konjugation ist eine gezielte Übertragung von DNA von einer Donor- in eine Rezipientenzelle, die an ein konjugatives/mobilisierbares Plasmid innerhalb des Donors gebunden ist und zum großen Teil von den Genprodukten des Plasmids vermittelt wird. Im Unterschied zur Transformation und der Transduktion kann die Konjugation in hohen Frequenzen auftreten. So wurde in einem indirekten Nachweis gezeigt, dass der Transfer der *Rhizobium*-Symbioseplasmide, die nahezu die vollständige Information für die symbiotische

Stickstofffixierung tragen, im Boden weit verbreitet ist (Valdes & Pinero, 1992). Ebenfalls mittels eines indirekten Nachweises konnte die Übertragung von katabolischen Plasmiden zwischen Bakterien der Gattung *Alcaligenes* und *Pseudomonas* belegt werden (Ka & Tiedje, 1994). Einen direkten Nachweis für einen Plasmidtransfer in die autochthone Mikroflora lieferten Smit *et al.* (1991) nach Beimpfung von Boden mit *Pseudomonas*-Stämmen. Wenig bekannt ist aber, wie häufig Konjugationen in natürlichen Systemen ohne zusätzliche Beimpfung stattfinden. Modellversuche mit Bodenbakterien deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von Pflanzen und organischem Material die Konjugation stimuliert (Richaume *et al.*, 1992). In anderen Experimenten scheint die Konjugation nach kurzzeitigem Umweltstress oder Anwesenheit von Pheromonen mit erhöhter Rate stattzufinden (Schäfer *et al.*, 1990; Clewell & Weaver, 1989).

Der Prozess der bakteriellen Konjugation – auch Plasmidkonjugation genannt – kann konzeptionell in zwei interagierende Funktionen unterteilt werden. In der ersten Funktion wird die DNA durch einen Komplex mehrerer Proteine prozessiert, von denen eines einen Einzelstrangsnchnitt innerhalb des *oriT*, dem Startpunkt der Konjugation, auslöst. Die als Relaxosom bezeichneten Proteine werden von den Genen der Dtr (DNA transfer + replication)-Komponente des Transfersystems des Plasmids kodiert. Die zweite Funktion vermittelt den DNA-Transfer von der Donor- in die Rezipientenzelle über die Ausbildung einer Konjugationsbrücke. Der hierfür notwendige Translokationsapparat – ein membran-assoziiertes Multiproteinkomplex – wird von den Genen des mpf (mating pair formation)-Komplexes des Plasmids kodiert (Hamilton *et al.*, 2000; Grohmann *et al.*, 2003).

Essentiell für die Konjugation ist das Zusammenwirken dieser beiden Funktionen. Obwohl beide Funktionen in gewisser Weise unabhängig sind, ist nicht in jedem Fall das Relaxosom eines konjugativen Plasmids über das mpf-System eines anderen transferierbar. Die Spezifität vermittelt zumindest teilweise ein einzelnes Protein (coupling protein), das das Relaxosom mit dem mpf-Komplex verbindet (Lessl *et al.*, 1992; Cabezón *et al.*, 1997; Llosa *et al.*, 2002).

Bezüglich des Vorhandenseins der genannten Funktionen lassen sich zwei Gruppen von Plasmiden unterscheiden. Zum einen existieren konjugative Plasmide, die meist etwas größer sind und die vollständige genetische Information für den konjugativen Transfer besitzen. Es gibt jedoch auch Plasmide, die lediglich über die Dtr-Funktion verfügen. Diese mobilisierbaren Plasmide sind bei der Übertragung auf die „Hilfe“ eines anderen Plasmids, das über eine mpf-Komponente verfügt, angewiesen. Dies deutet darauf hin, dass der horizontale Transfer bei diesen Plasmiden nur von „gelegentlicher“ Bedeutung ist.

Andererseits können die mobilisierbaren Plasmide nicht nur zusammen mit den konjugativen Plasmiden, sondern auch entgegengesetzt, vom Rezipienten in den eigentlichen Donor übertragen werden. Interessanterweise tritt dieser Retrotransfer mit ähnlicher Frequenz auf wie die direkte Mobilisierung (Mergeay *et al.*, 1987). Durch die konjugativen Plasmide erlangt das Bakterium somit nicht nur die Fähigkeit, seine genetische Information zu verbreiten, sondern kann auch die genetische Information anderer Zellen „anzapfen“. Das Phänomen des Retrotransfers könnte so, als ein quasi „aktiver“ Weg, neue genetische Informationen von anderen Organismen zu erlangen, eine große ökologische Bedeutung besitzen (Top, 1993).

Betrachtet man die vergleichsweise hohen Frequenzen der Plasmidkonjugation sowie die differenzierten Transferwege wird verständlich, dass der konjugative Transfer maßgeblich an der Verbreitung und Rekombination genetischen Materials innerhalb der Prokaryonten beteiligt ist (de la Cruz & Davies, 2000; Ochmann *et al.*, 2000) Die bakterielle Konjugation wird daher als wichtiger Faktor bei der Anpassung der Bakterien an sich ändernde Umweltbedingungen angesehen, was sich z. B. auch an der raschen Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen zeigt. In Abhängigkeit von den äußerst vielfältigen bakteriellen Habitaten haben sich im Laufe der Evolution unterschiedlichste Konjugationssysteme entwickelt, die einen effizienten Austausch genetischer Informationen auch unter verwandtschaftlich weit entfernten Arten erlauben.

### **7.1.1. Eigenschaften natürlicher Transfersysteme**

Die Mechanismen des konjugativen DNA-Transfers werden im folgenden am Beispiel der Transfersysteme der weit verbreiteten Broad-host-range-Plasmide der Inkompatibilitätsgruppe IncP1 und der Ti-Plasmide von *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben. Diese gut untersuchten Systeme lassen sowohl das einheitliche Grundkonzept als auch spezifische Besonderheiten als Ergebnis verschiedener evolutionärer Entwicklungen innerhalb der bakteriellen Konjugation erkennen.

#### **7.1.1.1. Broad-host-range-Plasmide der IncP1-Gruppe**

**Merkmale der IncP1-Plasmide.** Die Plasmide der IncP1-Inkompatibilitätsgruppe gehören zur stabilsten extrachromosomalen DNA innerhalb der low-copy-Plasmide und besitzen ein weites Wirtsspektrum sowohl hinsichtlich ihres konjugativen Transfers als auch ihrer vegetativen Replikation. Sie können in nahezu allen Proteobakterien repliziert und stabil erhalten sowie darüber hinaus auch in grampositive Bakterien, Hefen und eukaryotische Zelllinien transferiert werden (Heinemann & Sprague, 1989; Waters, 2001). Das enorme

Anpassungs- und Ausbreitungsvermögen wird durch eine sehr effiziente und komplexe Regulation der Funktionen innerhalb der Replikation, des Erhalts und des konjugativen Transfers erreicht. Ein besonderes Merkmal der IncP1-Plasmide ist ein zentrales Control-Operon, das für globale Regulatoren der Genexpression innerhalb der vegetativen Replikation, des stabilen Erhalts und des konjugativen Transfers codiert (Pansegrau *et al.*, 1994; Adamczyk & Jagura-Burdzy, 2003). Darüber hinaus tragen die IncP1-Plasmide zusätzlich Antibiotika- und Schwermetallresistenz-Gene sowie Genkassetten zur Vermittlung metabolischer Funktionen (Smith & Thomas, 1987; Burlage *et al.*, 1990; Pansegrau *et al.*, 1994; Thorsted *et al.*, 1998). Diese sogenannten „load genes“ stellen ein zusätzliches variables Schutzarsenal der Plasmide dar, das ihren Wirten ein Überleben auch unter extremen Umweltbedingungen ermöglicht.

Aufgrund ihrer Eigenschaften, insbesondere des breiten Wirtsbereichs, sind die IncP1-Plasmide ein wichtiges Werkzeug für die Konstruktion biotechnologisch bedeutsamer gentechnisch veränderter Bakterien der Arten *Pseudomonas*, *Rhizobium* und *Agrobacterium* (Ditta *et al.*, 1980; Haas & Reimann, 1998; Reimann & Haas, 1993). Zum anderen resultiert aus ihrer Organisation eine weite natürliche Verbreitung, was sowohl den Wirtsbereich als auch das Habitatspektrum betrifft (Top *et al.*, 1994; Gotz *et al.*, 1996).

**Transfersystem.** Das IncP-Transfersystem besteht entsprechend der o.g. funktionellen Gliederung aus zwei voneinander getrennten Plasmidregionen, *Tra1* und *Tra2*, deren Gene für insgesamt ~30 Proteine kodieren (Grohmann *et al.*, 2003).

*Tra1*-Region / Dtr-Funktion. Die *Tra1*-Region stellt die Dtr-Komponente des Transfersystems dar. Die Gene dieser Region kodieren für die Proteine des Relaxosoms, die in spezifischen Interaktionen mit dem *oriT* die rolling-circle-Replikation des Plasmids in Gang setzen. Bei den IncP1 $\alpha$ -Plasmiden liegen im *Tra1*-Bereich drei Operons: das Relaxase-Operon mit den Genen *traJIH*, das Primase-Operon (*traGFEDCBA*) und das leader-Operon mit den Genen *traKLM* (Pansegrau *et al.*, 1994). Innerhalb dieser Operons unterscheiden sich die Plasmide der verschiedenen IncP1-Subgruppen (IncP1 $\alpha$  und IncP1 $\beta$ ) partiell. So weist das Primase-Operon des Plasmids R751 der IncP1 $\beta$ -Gruppe durch das Fehlen der ersten beiden Gene (*traA*, *traB*) nur fünf anstelle von sieben Genen auf (Thorsted *et al.*, 1998). Die größten Unterschiede fanden sich bei den Genen *traJ* und *traK*, die für essentielle Relaxosom-Proteine kodieren. Diese Unterschiede stehen für eine hohe Spezifität der Initiierung der konjugativen Replikation über die Relaxosom-Bindung und *oriT*-Spaltung innerhalb der verschiedenen IncP1-Subgruppen. Yakobson & Guiney (1983) demonstrierten hierzu beispielhaft, dass ein

Plasmid, das vom *TraI*-Bereich des IncP1 $\alpha$ -Plasmids RK2 lediglich den *oriT* enthält, zwar durch RK2, nicht jedoch durch die IncP1 $\beta$ -Plasmide R751 und R772 mobilisierbar ist. Eine Mobilisierung konnte nur erzielt werden, wenn neben dem *oriT* auch die *traHIJK*-Gene von RK2 vorhanden sind.

Der *oriT*, der 250 bp umfassende Startbereich der Konjugation, ist das einzige in *cis* aktive essentielle Element des Transfers (Pansegrau *et al.*, 1994). In Sequenzvergleichen zeigte sich, dass der DNA-Bereich in der unmittelbaren Umgebung der Einzelstrang-Schnittstelle des *oriT* verschiedener Plasmidgruppen sowie auch des linken und rechten Borders der T-DNA der Ti-Plasmide der Agrobakterien hoch konserviert ist (Pansegrau & Lanka, 1991; Pansegrau *et al.*, 1994). Diese Konservierung lässt eine gemeinsame Herkunft der IncP1-vermittelten Konjugation und des T-DNA-Transfers in Pflanzen vermuten.

Der *oriT* der IncP1-Plasmide liegt zwischen den gegensätzlich transkribierten *traJ* und *traK*-Genen und enthält deren Promotersequenzen. Nach Pansegrau *et al.* (1994) stellt die Bindung von TraJ den ersten Schritt der Formierung des Relaxosoms dar. Im zweiten Schritt interagiert das Genprodukt von *traI* - die Relaxase - mit dem TraJ-*oriT*-DNA-Komplex. Der Zugriff der Relaxase (TraI) auf ihre Erkennungssequenz wird u. a. durch TraK begünstigt, indem dieses an die divergenten Promoterregionen bindet und die Expression der beiden Operons (Relaxase- und Leader-Operon) reguliert (Pansegrau *et al.*, 1990 und 1994; Zatyka *et al.*, 2001). An der Relaxosom-Formierung ist weiterhin das TraH-Protein beteiligt, das offenbar den Nukleoproteinkomplex stabilisiert. Wenn die Relaxosom-Formierung abgeschlossen ist, tritt ein Einzelstrangchnitt ein und die Relaxase (TraI) wird am 5'Ende des geschnittenen Strangs gebunden (Pansegrau & Lanka, 1996), womit der DNA-Transfer von der Donor- zur Rezipientenzelle als rolling-circle-Replikation starten kann.

Wie oben erwähnt, sind für den konjugativen Transfer Coupling-Proteine notwendig, die das Relaxosom mit dem mpf-Komplex verbinden. Diese Funktion kommt bei den IncP1-Plasmiden dem membranassoziierten Genprodukt von *traG* zu, das mit den Proteinen des mpf-Komplexes interagiert (Grahn *et al.*, 2000). Während die Reaktionen zur Relaxosom-Formierung und *oriT*-Spaltung schon innerhalb der IncP1-Subgruppen spezifisch sind, sind die Coupling-Proteine verschiedener Plasmide, auch unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen, oft untereinander ähnlich (Cabezón *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 2000), was auf ähnliche Eigenschaften und eine gewisse funktionelle „Gleichwertigkeit“ verschiedener Coupling-Proteine hinweist.

Tra2-Region / mpf-Funktion. Der konjugative Transfer ist auf eine molekulare Verbindung der Donor- und der Rezipientenzelle angewiesen. Hierzu bilden gramnegative Bakterien an der Außenseite der Zellen zunächst komplexe extrazelluläre Filamente (Pili) aus, die den physikalischen Kontakt der Zellen herstellen (Schumann, 1990). Danach wird eine Konjugationsbrücke ausgebildet, durch die die DNA in die Rezipientenzelle geschleust wird. Die zur Ausbildung des mpf-Komplexes gehörenden Prozesse werden größtenteils durch die Genprodukte der *Tra2*-Region (loci *trbB-L*) gesteuert (Pansegrau *et al.*, 1994; Haase *et al.*, 1995). Eine weitere an der Pilussynthese beteiligte Komponente - traF - wird vom *TraF*-Gen aus dem Primase-Operon der *Tra1*-Region kodiert (Haase & Lanka, 1997).

Über die mpf-Funktion - den Transportapparat der IncP1-Plasmide - lassen sich verschiedene nicht konjugative, mobilisierbare Plasmide übertragen. Hierzu gehören Vertreter der IncQ-Gruppe wie z.B. das Plasmid RSF 1010 (Willetts & Crowther, 1981; Fullner & Nester, 1996).

Auch die Fähigkeit der IncP1-Plasmide, sich in ein weites Wirtsspektrum, darunter in eukaryotische Zellen (Hefe), zu integrieren, wird hauptsächlich durch ihren mpf-Apparat einschließlich der traF-Komponente determiniert. Dies belegten Bates *et al.* (1998) anhand der Mobilisierung eines IncQ-basierten Shuttleplasmids, das sein eigenes DNA-Prozessierungssystem (*oriT* + Mobilisierungsgene) besitzt. Das Konstrukt konnte nur über ein IncP-Plasmid, nicht aber über ein IncI-Plasmid, welches IncQ-Plasmide im Rahmen der bakteriellen Konjugation mobilisieren kann (Willetts & Crowther, 1981), in Hefezellen transferiert werden.

Für die verschiedenen Funktionen des mpf-Apparates der IncP1-Plasmide gibt es homologe Komponenten in anderen konjugativen Transfersystemen, aber auch beim Transfer von Virulenzfaktoren in eukaryotische Organismen wie dem T-DNA-Transfer in Pflanzen oder den Export von Effektor-Proteinen durch Humanpathogene (z.B. *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*) (Pansegrau *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2000).

#### **7.1.1.2. Struktur der Ti-Plasmide von *Agrobacterium tumefaciens***

Die IncRh1-Ti-Plasmide von *Agrobacterium tumefaciens* tragen zwei Transfersysteme – das *vir*-System, das vorrangig den Transfer eines Teils des Plasmids, der T-DNA, in das Pflanzengenom vermittelt, sowie ein konjugatives System (*Tra*), bei dem das gesamte Plasmid von der Agrobakterien-Donorzelle in einen bakteriellen Rezipienten übertragen wird.

**Tra-System des konjugativen Transfers.** Das konjugative System der Ti-Plasmide erlaubt die Verbreitung der Ti-Plasmide und verschafft den Ti-Plasmid freien Agrobakterien die damit verbundenen Vorteile (Kerr & Ellis, 1982). Der Wirtsbereich der Ti-Plasmide umfasst

neben *Agrobacterium tumefaciens* andere gramnegative Bakterien wie *Rhizobium trifolii* (Hooykaas *et al.*, 1977) und *E. coli* (Sprinzel & Geider, 1988).

Normalerweise ist der konjugative Transfer unterdrückt, er kann jedoch durch spezifische (konjugative) Opine<sup>1</sup> induziert werden (u.a. Petit *et al.*, 1978). Verfügt das *Agrobacterium* über das Ti-Plasmid zur Transformation von Pflanzenzellen, nutzt es die von den veränderten Pflanzen synthetisierten Opine als Nahrungsquelle. Gleichzeitig dienen die Opine als Signalsubstanzen zur Stimulation der Verbreitung des Ti-Plasmids über die bakterielle Konjugation (Farrand, 1989). Dabei ist das *Tra*-System funktionell vom *vir*-System unabhängig, das heißt, es besitzt alle für den konjugativen Transfer notwendigen Komponenten. (Cook *et al.*, 1997). Die Verbreitung der Ti-Plasmide in dieser Phase führt so dazu, dass möglichst viele Agrobakterien die spezifische Nahrungsquelle der Opine nutzen können.

Wie bei den IncP1-Plasmiden besteht das konjugative Transfersystem der Ti-Plasmide aus zwei voneinander getrennten Einheiten. Sie werden als *tra*- und *trb*-Region bezeichnet. In der *tra*-Region, der Dtr-Komponente, liegen der *oriT*, zwei Transfer-Operons (*traI* und *traII*) sowie ein weiteres Operon (*acc*), das für Funktionen beim Abbau der konjugativen Opine kodiert (Cook & Farrand, 1992; Alt-Mörbe *et al.*, 1996). Die von der Dtr-Komponente gesteuerten Reaktionen bei der Relaxosombildung und beim spezifischen DNA-Einzelstrang-schnitt verlaufen prinzipiell wie für die IncP1-Plasmide beschrieben. Allerdings ähneln der *oriT* und die Dtr-Gene des *Tra*-Systems der Ti-Plasmide meist stärker denen des IncQ-Plasmids RSF1010 als denen der IncP1-Plasmide (Cook & Farrand, 1992; Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Farrand *et al.*, 1996). Das Coupling-Protein *TraG* steht hingegen seinem Counterpart in den IncP1-Plasmiden näher (Alt-Mörbe *et al.*, 1996). So kommen Alt-Mörbe *et al.*, 1996 nach Vergleichen aller Einzelkomponenten der *tra*-Region mit den jeweiligen Komponenten anderer Transfersystemen zum Ergebnis, dass allein diese Region der Ti-Plasmide evolutionär auf mindestens drei Quellen zurückgeht.

Die zweite Region des konjugativen Transfersystems - *trb* - umfasst analog zur *Tra2*-Region der IncP-Plasmide 12 Gene, deren Produkte den mpf-Apparat ausbilden. Im Unterschied zur *tra*-Region weisen die Proteine der *trb*-Region übereinstimmend Homologien zu ihren IncP1-Counterparts auf (Alt-Mörbe *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998).

---

<sup>1</sup> Konjugative Opine stellen eine Gruppe spezifischer Kohlenstoffverbindungen dar, die nur in den Kronengallen gebildet werden und den konjugativen Transfer der Ti-Plasmide induzieren.



**vir-System des T-DNA-Transfers.** Die genetische Transformation von Pflanzenzellen durch die Vermittlung der *vir*-Gene von *Agrobacterium tumefaciens* ist das einzige bekannte Beispiel für einen in der Natur mit detektierbarer Effizienz auftretenden Trans-Kingdom-DNA-Transfer (de la Cruz & Lanka, 1998). Über die Pflanzentransformation hinaus sind Agrobakterien durch ihre *vir*-Gene auch in der Lage, DNA in andere Eukaryonten, wie Hefen (Piers *et al.*, 1996; Bundock *et al.*, 1995 und 1999), filamentöse Pilze (de Groot *et al.*, 1998; Eckert *et al.*, 2005) sowie in verschiedene humane Zelltypen (Kunik *et al.*, 2001) zu übertragen.

Der T-DNA-Transfer wird von sechs Virulenzoperons (*VirA,B,C,D,E,G*) der ~35 bis ~50 kb umfassenden *vir*-Region vermittelt (Christie, 1997). Zwei der *vir*-Operons (*virA/virG*) kodieren für ein Signal-Transduktionssystem zur Aktivierung der des *vir*-Systems. Von den Genprodukten der übrigen Operons wird der eigentliche DNA-Transfer vermittelt. Nach de la Cruz & Lanka (1998) kann der Transferprozess in folgende Schritte untergliedert werden:

- (a) Ausbildung des Kontaktes zwischen der Bakterien- und der Pflanzenzelle
- (b) Aktivierung und Expression der Gene für die Vir-Proteine
- (c) *Prozessierung der T-DNA*
- (d) *Aktivierung und Transport des T-Stranges*
- (e) *Transport des T-DNA Komplexes zum Pflanzenzytoplasma*
- (f) T-DNA-Überführung zum Pflanzenzellkern
- (g) chromosomale DNA-Integration

In den Schritten *c*, *d* und *e* ähnelt der T-DNA-Transfer der bakteriellen Konjugation, während die Schritte *a*, *b* und *g* Besonderheiten des Gentransfers in Pflanzen bzw. Eukaryonten darstellen (de la Cruz & Lanka, 1998). So entspricht die Prozessierung der T-DNA (*c*) und die Aktivierung des T-Stranges zum Transport (*d*) der *Dtr*-Funktion, die im konjugativen Transfersystem durch die Gene der *TraI*-Region bestimmt wird. Im *vir*-System codieren für diese Funktionen das *virD*- und *virC*-Operon (Ghai & Das, 1989; Toro *et al.*, 1989). Die 25 bp umfassenden Grenzen der T-DNA (linker und rechter Border; LB, RB) entsprechen dem *oriT* der bakteriellen Konjugation. RB und LB weisen deutliche Sequenzhomologien zum *oriT* des IncP1-Plasmids RP4 auf (Pansegrau & Lanka, 1991). Für die Prozessierung der T-DNA sind zwei Produkte des *virD*-Operons, die Proteine VirD2 und VirD1, entscheidend. Das Protein VirD2, das der *oriT*-spezifischen Relaxase von RP4 (*TraI*) strukturell stark ähnelt, (Pansegrau & Lanka, 1991; Waters & Guiney, 1993) schneidet den unteren Strang der Bordersequenzen zwischen dem dritten und vierten Basenpaar des linken und rechten Borders und bleibt wie *TraI* beim konjugativen Transfer am 5'Ende der einzelsträngigen T-DNA

kovalent gebunden (Yanofski *et al.*, 1986). Dies verhindert den Zugriff von Exonukleasen (Dürrenberger *et al.*, 1989) und markiert das 5'Ende als Kopf-Region des T-DNA Transferkomplexes. Nach dem Schnitt wird die ausgeschnittene DNA abgelöst und die entstandene Einzelstranglücke wieder „aufgefüllt“. *In vitro* Versuche mit gereinigten VirD2- und TraI-Enzymen ergaben, dass VirD2 neben den Schnittstellen innerhalb der T-DNA-Border auch den *oriT* von RP4 spalten kann, während TraI nur innerhalb des RP4-Systems agiert (Pansegrau *et al.*, 1993a,b; Scheiffele *et al.*, 1995). Das VirD1-Protein ist, wie sich ebenfalls *in vitro* zeigte, bei der Spaltung einzelsträngiger DNA entbehrlich, jedoch essentiell bei der Spaltung doppelsträngiger DNA und der Generierung des freien T-DNA-Komplexes (Winans, 1992; Scheiffele *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis stützt die Vorstellung, dass die Funktion von VirD1 mit der Funktion des Proteins TrJ bei RP4 identisch ist, welches mit dem *oriT* interagiert und so eine Voraussetzung für die Bindung von TraI (Relaxase) an den *oriT*-DNA-Protein-Komplex schafft.

Neben den Hauptkomponenten VirD2 und VirD1 spielen bei der T-DNA Prozessierung wahrscheinlich auch einige *virC*-Produkte eine Rolle. So wurde gezeigt, dass VirC1 innerhalb der „overdrive“ Sequenz, die sich unmittelbar neben dem rechten T-DNA Border befindet, bindet und damit die Spaltungsreaktion forciert (Toro *et al.*, 1989). Einzelne Autoren gehen aber auch davon aus, dass die VirC-Proteine (VirC1/2) für die T-DNA Prozessierung nicht essentiell sind, sondern lediglich die Transfereffizienz in die Pflanzenzellen erhöhen, was ihre Bedeutung beim T-DNA Export ausweisen würde (Zhu *et al.*, 2000).

Der ebenfalls mit der bakteriellen Konjugation vergleichbare T-DNA-Transport zum Pflanzenzytoplasma (Schritt e) wird von Genprodukten des *virB*-Operons veranlasst. Diese sind an der Synthese der für den Kontakt zu den Pflanzenzellen erforderlichen Pili beteiligt und steuern die Ausbildung des membranassoziierten mpf-Komplexes. Neben verschiedenen chromosomalen Genen (Winans, 1992) ist das Protein VirB2 für die Pilusausbildung verantwortlich (Fullner *et al.*, 1996). Zwei der insgesamt 11 VirB-Proteine, VirB4 und VirB11, zeigen ATPase-Aktivität und dienen damit wahrscheinlich als Energielieferanten des Transportprozesses (Berger & Christie, 1994; Christie, 1997). Im Gegensatz zu den *virD*- und *virC*-Genen weisen die *virB*-Komponenten zu ihren Counterparts bei RP4 (IncP1) geringere Sequenzhomologien auf. Sie entsprechen in der Sequenz stärker den Komponenten der Broad-host-range-IncN-Plasmide (*tra*-Gene). Einige der *virB*- und der IncN-Tra-Proteine sind darüber hinaus den Tra-Proteinen des *E. coli*-F-Plasmids ähnlich, was auf eine gemeinsame Herkunft dieser Transferapparate hinweist (Firth *et al.*, 1996; Christie, 1997). Auch Ähnlichkeiten der *virB*-Gene mit den Komponenten von Transfersystemen, die ebenso

Virulenzfaktoren vermitteln (z.B. *Bordetella pertuissi*, *Brucella suis*), wurden nachgewiesen (Hamilton *et al.*, 2000).

Die Verbindung der *virB*-Konjugationsbrücke mit dem T-DNA-Proteinkomplex stellt das an der inneren Zellmembran liegende VirD4-Coupling-Protein her (Kumar & Das, 2002). Dieses Protein ist wiederum den Coupling-Proteinen von RP4 (IncP1) und des konjugativen Ti-Transfersystems homolog (Hamilton *et al.*, 2000). Über die Koppelung des mpf-Apparates an das VirD4-Protein vollzieht sich der Transfer des T-DNA-VirD2-Komplexes zur Pflanzenzelle. Ist dieser Komplex dort angelangt, wird der DNA-Proteinkomplex zum Schutz vor Endonukleasen der Pflanzenzelle mit dem ssB(single-stranded binding)-Protein VirE2-umhüllt (Rossi *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen zeigten, dass VirE2 auch Transportfunktionen hat, womit es an der Bildung des Kanals für den Transport des T-DNA-VirD2-Komplexes in die Pflanzenzelle beteiligt sein könnte (Dumas *et al.*, 2001). SsB-Proteine werden auch von zahlreichen konjugativen Plasmiden kodiert. Die Funktionen dieser Proteine entsprechen weitgehend den Funktionen von VirE2 (Christie *et al.*, 1988).

Betrachtet man die Homologien der verschiedenen Komponenten des *vir*-Systems zu anderen Transfersystemen, zeigt sich auch hier, wie bereits beim *Tra*-System, seine chimäre Struktur. Diejenigen Operons, die für zentrale Funktionen bei der T-DNA-Prozessierung kodieren sowie auch der *oriT* (Borders) und das Coupling-Protein ähneln größtenteils den entsprechenden Bereichen / Funktionen von RP4 (IncP1). Das *virB*-mpf-System für den DNA-Transport von der Bakterien- in die Pflanzenzelle steht dagegen verwandtschaftlich den mpf-Systemen von Plasmiden der IncN-Inkompatibilitätsgruppe sowie auch anderer Pathogene nahe, die ebenfalls im Rahmen des Interkingdom-Transfers Effektormoleküle in eukaryotische Zellen transferieren (Christie, 2001).

Alle für die Pflanzentransformation wichtigen Komponenten des *vir*-Systems - die Gesamtheit der *vir*-Gene, das Vorhandensein der beiden T-DNA-Bordersequenzen, aber auch die Induktion der *vir*-Gene durch „Wundsignale“ (Phenole, Monosaccharide) - sind, wie Piers *et al.* (1996) am Beispiel von *S. cerevisiae* zeigten, offensichtlich auch die Basis für den zumindest unter Laborbedingungen möglichen Gentransfer in andere eukaryontische Organismen.

### **7.1.1.3. Vermittlung des konjugativen Transfers durch das *vir*-System**

Im Zusammenhang mit den strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten des T-DNA Transfers mit den Systemen der bakteriellen Konjugation im Bereich der DNA-Prozessierung bis hin zum DNA-Transport stellt sich die Frage, inwieweit einzelne Funktionen des T-DNA-

Transfers und der bakteriellen Konjugation äquivalent sind und ob schließlich das *vir*-System unabhängig vom Vorhandensein eines Konjugationssystems einen konjugativen Gentransfer vermitteln kann.

Beijersbergen *et al.* (1992) untersuchten hierzu, ob die Vir-Proteine des *vir*-Systems einen konjugativen Plasmidtransfer innerhalb der Agrobakterien vermitteln können. Sie verwendeten hierzu ein IncQ-Plasmid (RSF1010-Derivat), das zu seiner Mobilisierung die Transferfunktionen (mpf) eines konjugativen Plasmids benötigt. In verschiedenen Schritten wiesen sie nach, dass dieses Plasmid durch das Ti-Helferplasmid, das von den beiden Transfersystemen nur noch über das *vir*-System verfügt, mobilisiert werden kann. Voraussetzung war jedoch die Aktivierung der *vir*-Gene durch die Kultivierung der Agrobakterien auf einem „Inducer-Medium“ (Acetosyringon). Diese Induktion entspricht der Stimulierung des T-DNA-Transfers durch die Opine im natürlichen System *Agrobacterium*-Pflanze. Die Autoren wiesen nach, dass der T-DNA-Transportkomplex einschließlich des Coupling-Proteins auch zusammen mit einem konjugativen Relaxosom agieren kann, wodurch das Plasmid RSF1010 innerhalb der Agrobakterien übertragen wurde. In späteren Untersuchungen von Fullener & Nester (1996) wurden die Ergebnisse von Beijersbergen *et al.* (1992) konkretisiert. Hier zeigte sich, dass die Mobilisierung von RSF1010 innerhalb von *A. tumefaciens* nicht nur wie zuvor angenommen einige, sondern sämtliche Gene des *virB*-Operons (*virB1-virB11*) sowie das *virD4*-Gen erfordert. Das IncQ-Plasmid RSF1010 nutzt somit für seine Übertragung die gesamte „Transportmaschinerie“ des T-DNA-Transfers. Weiterhin fanden Fullener & Nester (1996) eine klare Temperaturabhängigkeit der IncQ-Mobilisierung. So wurden übereinstimmend zur temperaturabhängigen pflanzlichen Tumorbildung nach Agrobakterieninfektion, optimale Transferraten der bakteriellen Konjugation nach Inkubation der Agrobakterien bei 19°C nachgewiesen, während bei über 28°C kein Transfer mehr stattfand. Der am IncQ-Plasmid pML122 beobachtete Temperatureffekt wurde von Fullener & Nester (1996) auf Schäden in den mpf-Funktionen des T-DNA-Transfersystems zurückgeführt, da das Plasmid pML122 auch bei höheren Temperaturen innerhalb der Agrobakterien übertragen wurde, wenn die Donorzellen zusätzlich ein konjugatives IncP1-Plasmid beherbergten. Sehr wahrscheinlich hängen die temperaturbedingten Störungen des Transfers mit der Temperatursensitivität der Pilusbildung zusammen. Fullner *et al.* (1996) zeigten, dass Agrobakterienzellen bei Expression der *virB*- und *virD4*-Gene lange, flexible Pilusstrukturen ausbilden. Diese waren bei Inkubation der Zellen von ~19 bis 22°C häufig, bei ~28°C dagegen selten zu beobachten.

Einen weiteren grundsätzlichen Beleg für die Vermittlung eines konjugativen Transfers durch das *vir*-System erbrachten Buchanan-Wollaston *et al.* (1987) am Beispiel der Übertragung von RSF1010 von Agrobakterien- in Pflanzenzellen. Der Transfer erwies sich von den *oriT*-Sequenzen und den *mob*-Genen von RSF1010 sowie von den *vir* Genen des Helferplasmids abhängig (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987; Ward *et al.*, 1991). Vor diesem Hintergrund hat sich interessanterweise gezeigt, dass Agrobakterien, die gleichzeitig eine T-DNA und ein IncQ-Plasmid tragen, das IncQ-Plasmid zwar effizient in die Pflanzenzelle transferieren, jedoch kaum pflanzliche Tumoren auslösen (Ward *et al.*, 1991). Die Unterdrückung der Tumorbildung wird teilweise aufgehoben, wenn die Gene *virB9*, *virB10* und *virB11* überexprimiert werden (Ward *et al.*, 1991). Offenkundig zeugt dies von einer Konkurrenz zwischen den T-Komplex- und IncQ-Substraten um den DNA-Transport.

### **7.1.2. Eigenschaften binärer Plasmidvektoren für die Pflanzentransformation**

Das binäre Vektorsystem basiert auf der natürlichen *Agrobacterium*-vermittelten Pflanzentransformation und stellt das am häufigsten genutzte Vektorsystem bei der gentechnischen Veränderung von Pflanzen dar. Es besteht aus dem Plasmidvektor, der die in das Pflanzengenom zu inserierende DNA trägt, und einer zweiten Komponente - einem veränderten Ti-Plasmid, auch Helferplasmid genannt, das über die *vir*-Region zum Transfer der T-DNA des Vektors verfügt (Hoekema *et al.*, 1983; Bevan, 1984). Der für die Pflanzentransformation konstruierte Plasmidvektor ist ein in *E. coli* und Agrobakterien replizierbares kleines Broad-host-range-Replikon von etwa 10 kb. Es enthält die T-DNA-Region, aus der die Gene für die Tumorbildung / Phytohormonsynthesen entfernt wurden und an deren Stelle zwischen dem linken und rechten Border das „gene of interest“ zwischen einer Promotor- und Terminatorsequenz sowie analog ein pflanzlicher Selektionsmarker (Antibiotika- und/oder Herbizidresistenzgen) inseriert wurden. Außerhalb der T-DNA liegen auf dem Vektor ein Plasmid-Replikationsbereich sowie ein bakterieller Selektionsmarker (Antibiotikaresistenz). Der Plasmidvektor wird zunächst in *E. coli* konstruiert und dann in *A. tumefaciens* übertragen. Hier befindet sich die zweite Komponente des binären Systems, das Helferplasmid, welches dem Transfer der T-DNA dient.

Seit ihrer Einführung durch Hoekema *et al.*, 1983 wurden zahlreiche binäre Vektoren für die Pflanzentransformation konstruiert und in ihren Nutzungsmöglichkeiten weiterentwickelt (Tabelle 4). Kennzeichnend für die neueren Vektoren ist ihre geringe Größe sowie ihre Flexibilität hinsichtlich ihrer Handhabung und ihres Anwendungsbereiches. Viele Vektoren besitzen einen Broad-host-range-Replikationsursprung (*oriV*), der ihren Erhalt in einem

weiten Spektrum gramnegativer Bakterien einschließlich *E. coli* ermöglicht. Da Broad-host-range-Plasmide mit einem RK2-*oriV* wie pBIN19 jedoch in *E. coli* nur in geringer Kopienzahl vorliegen, wurde bei einer Reihe von Plasmiden ein zweiter *E. coli*-spezifischer Replikationsbereich (oft ColE1) eingefügt. Einzelne Vektoren wie pC22 und pCGN1547 haben den *oriV* des Ri-Plasmids von *Agrobacterium rhizogenes* und den ColE1-*oriV* zum Erhalt in *E. coli*. Die pGreen Vektoren enthalten sowohl einen Broad-host-range-*ori* (pSa) und einen ColE1-*ori* eines puC-Derivats.

Bei den meisten Vektoren handelt es sich um mobilisierbare Plasmide. Die Übertragung des Vektorplasmids von *E. coli* auf *A. tumefaciens* erfolgt häufig konjugativ über das „triparental mating“<sup>1</sup> oder durch Transformation (meist über Elektroporation). Die Nutzung der vergleichsweise sehr kleinen pGreen-Vektoren setzt eine Transformation der Agrobakterien voraus (Tabelle 4). Da bei diesen Vektoren im Interesse der geringen Größe wesentliche Replikationsfunktionen entfernt wurden, sind sie in *A. tumefaciens* nur bei Anwesenheit eines zweiten Plasmids (pSoup) replizierbar (Hellens *et al.*, 2000a).

Tabelle 4: Eigenschaften ausgewählter binärer Ti-Vektoren (nach Hellens *et al.*, 2000a, verändert).

Vektor	Größe (bp)	Bakterielle Selektion	Marker bei	Replikationsbereich <i>A. tumefac.</i>	<i>E. coli</i>	Mobilisierbarkeit	Referenz
pBIN19	11777	Kanamycin	RB	pRK2	pRK2	+	Bevan (1984)
pC22	17500	Ampicillin, Streptomycin, Spectinomycin	RB	pRi	ColE1	+	Simoens <i>et al.</i> (1986)
pGA482	13200	Tetracyclin	RB	pRK2	ColE1	+	An <i>et al.</i> (1985)
pPCV001	9200	Ampicillin	RB	pRK2	ColE1	+	Koncz & Schell (1986)
pCGN1547	14440	Gentamicin	LB	pRi	ColE1	+	McBride & Summerfelt (1990)
pJJ1881	25700	Tetracyclin	LB	pRK2	pRK2	+	Jones <i>et al.</i> (1992)
pPZP111	8909	Chloramphenicol	LB	pVS1	ColE1	+	Hajdukiewicz <i>et al.</i> (1994)
pGreen0029	4632	Kanamycin	LB	pSa	pUC	-	Hellens <i>et al.</i> (2000b)
pCambia-serie	7000 - 12000	Chloramphenicol oder Kanamycin	LB	pVS1	pMB1	+	www.cambia.org

<sup>1</sup> Hierbei wird der binäre Vektor aus einem *E. coli*-Stamm in den vorgesehenen *Agrobacterium*-Stamm mittels eines Helferplasmids mobilisiert. Das Helferplasmid befindet sich in einem weiteren *E. coli*-Stamm. Im ersten Schritt wird dieses Plasmid in den binären Vektor tragenden *E. coli*-Stamm übertragen. Dort stellt es die Transferfunktionen für die Übertragung des binären Vektors in den *Agrobacterium*-Stamm zur Verfügung. Das Helferplasmid kann hierbei selbst auch mit in den *Agrobacterium*-Stamm übertragen werden, kann sich dort jedoch nicht replizieren und wird ausverdünnt. Nach wenigen Generationen bleibt so nur der binäre Vektor im *Agrobacterium*-Stamm erhalten.

Die für die Pflanzentransformation verwendeten Agrobakterienstämme sind durch ihren chromosomalen Hintergrund und das beherbergte Ti-(Helfer)Plasmid charakterisiert (Tabelle 5). Besonders bewährt haben sich C58-Agrobakterienstämme mit unterschiedlichen Formen von veränderten Ti-Plasmiden, die zumindest keine T-DNA und oft auch weitere Teile des ursprünglichen Plasmids nicht mehr enthalten .

Tabelle 5: Eigenschaften ausgewählter rekombinanter *A. tumefaciens*-Stämme (nach Hellens *et al.*, 2000a).

Stamm	Chromosomal		Ti-Helferplasmid		Opin <sup>b</sup>	Referenz
	Typ	Marker <sup>a</sup>		Marker <sup>a</sup>		
LBA4404	TiAch5	rif	PAL4404	spec + strep	Octopin	Hokema <i>et al.</i> (1983)
GV2260	C58	rif	pGV2260 (pTiBS3 Δ T-DNA)	carb	Octopin	McBride & Summerfelt (1990)
C58C1	C58	-	cured	-	Nopalin	Deblaere <i>et al.</i> (1985)
GV3100	C58	-	cured	-	Nopalin	Holsters <i>et al.</i> (1980)
A136	C58	rif + nal	cured	-	Nopalin	Watson <i>et al.</i> (1975)
GV3101	C58	rif	cured	-	Nopalin	Holsters <i>et al.</i> (1980)
GV3850	C58	rif	pGV3850 (pTiC58 Δ onc. Gene)	carb	Nopalin	Zambryski <i>et al.</i> (1983)
GV3101::pMP90	C58	rif	pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA)	gent	Nopalin	Koncz & Schell (1986)
GV3101::pMP90K	C58	rif	pMP90RK (pTiC58 Δ T-DNA)	gent + kan	Nopalin	Koncz & Schell (1986)
EHA101	C58	rif	pEHA101 (pTiBo542 Δ T-DNA)	kan	Nopalin	Hood <i>et al.</i> (1986)
EHA105	C58	rif	pEHA105 (pTiBo542 Δ T-DNA)	-	Succin-- amopin	Hood <i>et al.</i> (1993)
AGL-1	C58, RecA	rif + carb	pTiBo542 Δ T-DNA	-	Succin- amopin	Lazo <i>et al.</i> (1991)

<sup>a</sup> Antibiotika-Resistenzgene zur Selektion des Stammes bzw. T-Plasmids: rif: Rifampicin; gent: Gentamycin; nal: Nalidixinsäure; kan: Kanamycin; carb: Carbenicillin; spec: Spectinomycin; strep: Streptomycin; -: kein Marker vorhanden

<sup>b</sup> Gruppierung nach Opininmetabolismus des Herkunftsstammes und/oder des unveränderten Ausgangs-Ti-Plasmids

Durch verschiedene Modifikationen der Virulenz dieser Stämme konnte der Wirtsbereich der Agrobakterien, der inzwischen auch Monocotyle (Getreide, Mais) umfasst, ausgedehnt werden. Eine wichtige Modifikation innerhalb der Virulenz ist die Verstärkung bzw. die

Veränderung des Expressionsstatus des *virG*-Gens sowie die erhöhte Expression des Gens für das ssB (single-stranded binding)-Protein VirE2 (Hellens *et al.*, 2000a; Sheng & Citowski, 1996; Zupan *et al.*, 2000). Die Bildung des für die Transkription des *vir*-Clusters wichtigen *virG*-Produktes und des VirE2-Proteins kann in konventionellen Agrobakterienstämmen beim T-DNA-Transfer limitierend sein. Daher wurde für die Übertragung großer DNA-Fragmente (>50 kb) ein spezialisiertes binäres Vektorsystem (BiBAC - binary bacterial artificial chromosome) entwickelt (Hellens *et al.*, 2000a). Bei diesem System tragen die Agrobakterienstämmen ein weiteres Helferplasmid und damit zusätzliche Kopien der *virG*- und *virE*-Gene, deren Produkte den Transfer großer und komplexer DNA-Abschnitte effizient unterstützen (Hamilton *et al.*, 1996).

### **7.1.3. Möglichkeiten eines konjugativen Gentransfer transgener DNA aus rekombinanten *Agrobacterium*-Stämmen**

Mit dem binären Vektorsystem steht für die Pflanzentransformation ein Verfahren zur Verfügung, das einen effizienten DNA-Transfer von rekombinanten Agrobakterien in ein breites Spektrum von Pflanzenarten, darunter auch in zahlreiche Gehölze, erlaubt. Speziell bei der Regeneration von Gehölzen bleiben die verwendeten Agrobakterien im Pflanzengewebe jedoch längere Zeit erhalten und besiedeln damit das gleiche Habitat wie die „gehölzeigene“ endophythische Mikroflora. Durch die unmittelbare Nähe der Agrobakterien zu den Endophyten ist es prinzipiell denkbar, dass über die Transferfunktionen des binären Vektorsystems (Vektor + Helferplasmid) rekombinante DNA konjugativ auf endophythische Bakterien übertragen wird. Geht man hierbei von den beschriebenen Eigenschaften der natürlichen Konjugationssysteme und der binären Vektoren aus, kommen folgende grundsätzliche Transferwege in Betracht:

- (1) Konjugativer Transfer des binären Vektors über das *vir*-System des Helferplasmids
  - (2) T-DNA-Transfer und -Integration in das Bakterienchromosom
  - (3) Mobilisierung des binären Vektors durch ein externes Plasmid aus der Endophytenflora
- (1)** Der erste Weg - der von den *vir*-Genen des Helfers vermittelte konjugative Transfer des Plasmidvektors - kann als wahrscheinlich angenommen werden. Dies stützt sich insbesondere auf die Ergebnisse von Beijersbergen *et al.* (1992) und Buchanan-Wollston *et al.* (1987), die am Beispiel eines mobilisierbaren IncQ-Plasmids zeigten, dass das *vir*-System der Ti-Plasmide einen konjugativen Plasmidtransfer sowohl in Bakterien als auch



in Pflanzenzellen vermitteln kann. Bei den gebräuchlichen binären Vektoren ist keine vollständige Dtr-Komponente eines konjugativen/mobilisierbaren Plasmids mehr vorhanden, jedoch könnte eine Konjugation hier vom rechten Border der T-DNA ausgehen. Wie unter 7.1.1.2 erwähnt, entsprechen die die T-DNA eingrenzenden linken und rechten Bordersequenzen dem *oriT* der bakteriellen Konjugation. Somit könnte der rechte Border als *oriT* fungieren und zusammen mit den *vir*-Genen ein vollständiges Konjugationssystem darstellen. Nachweise eines konjugativen Transfers der binären Vektoren sind aus der Literatur nicht bekannt, es sind aber auch keine prinzipiellen Hindernisse ersichtlich. Ein Argument, welches gegen den Transfer des gesamten binären Vektors sprechen würde, ist das Vorhandensein von zwei Bordersequenzen. Aus der Pflanzentransformation ist jedoch bekannt, dass durchaus der linke Border überlesen werden kann (in 20-30% der Transformanten), so dass nicht nur der T-DNA-Bereich, sondern darüber hinausgehende DNA bzw. der vollständige Vektor in die Pflanzenzelle transferiert wird (Martineau *et al.*, 1994; van der Graaff *et al.*, 1996). Analog zum normalen T-DNA-Transfer würde das Helferplasmid so den Transfer des gesamten Vektors in die endophytische Bakterienzelle vermitteln. Ein solcher konjugativer Transfer in Bakterienzellen könnte noch begünstigt werden, wenn im verwendeten Vektorsystem zur Verbesserung der Effizienz des T-DNA-Transfers die Expression bestimmender Virulenzfaktoren (vgl. 7.1.2) gesteigert wurde.

Neben dem eigentlichen Plasmidtransfer muss für eine erfolgreiche Konjugation der Erhalt des Plasmids im Rezipienten gewährleistet sein. Eine weitere Bedingung ist also die Replizierbarkeit des Vektorplasmids in den endophytischen Arten. Da der Replikationsbereich (*oriV*) vieler binärer Vektoren aus Broad-host-range-Plasmiden wie dem IncP1-Plasmid RK2 stammt, dürften die Plasmide in zahlreichen, auch verwandtschaftlich weit auseinanderliegenden Bakterienarten erhalten und vermehrt werden.

- (2) Darüber hinaus kommt auch der klassische T-DNA-Transfer für die Übertragung rekombinanter DNA in endophytische Bakterien in Betracht. Diese Möglichkeit geht davon aus, dass sich über das *vir*-System der Ti-Plasmide nicht nur Pflanzen, sondern zumindest unter Laborbedingungen auch verschiedenste andere eukaryotische Zelltypen transformieren lassen (vgl. 7.1.1.2). Obwohl Prokaryonten „natürlicherweise“ andere Transfermechanismen nutzen, besteht zumindest theoretisch die Möglichkeit, dass T-DNA auch in Bakterien gelangen und dort ähnlich wie bei eukaryotischen Organismen in

das Chromosom integriert werden könnte. Der Nachweis solcher Transferereignisse ist in der Literatur bisher jedoch nicht beschrieben.

- (3) Auch der dritte Weg des konjugativen Transfers auf die Endophyten - die Mobilisierung des binären Vektors durch ein externes endophytisches Plasmid - ist grundsätzlich nicht auszuschließen, jedoch an bestimmte Ausgangsbedingungen gebunden. Wie in Abschnitt 7.1.2 erwähnt, verfügen die binären Vektoren nicht mehr über einen vollständigen *mob*-Bereich. Daher kann die Mobilisierung nur mit einem dem *mob*-Bereich des jeweiligen binären Vektors eng verwandten Plasmid erfolgen, da die *mob*-Region des binären Vektors komplementiert werden muss. (In Abschnitt 7.1.1.1 ist für die IncP-Plasmide dargestellt, dass die für die Mobilisierung notwendige Relaxosombildung und *oriT*-Spaltung der einzelnen Plasmide hochspezifisch ist. Das heißt, eine Mobilisierung erfolgt nur, wenn das Plasmid neben dem *oriT* auch die plasmidspezifischen Erkennungsstellen für die Mobilisierungsproteine und die entsprechenden Mobilisierungsgene (*Dtr*-Funktion) besitzt. Fehlen essentielle Mobilisierungsgene, müssen diese durch ein gleiches oder eng verwandtes Plasmid in derselben Zelle komplementiert werden.) Zum Beispiel kann der Vektor pBin19 nur bei Anwesenheit des vollständigen „Herkunftsplasmids“ des *oriT* (RK2) oder eines Vertreters der gleichen Subgruppe (IncP1 $\alpha$ ) in derselben Zelle mobilisiert werden. Dazu müsste ein passendes IncP1 $\alpha$ -Plasmid aus der endophytischen Mikroflora über eine Konjugation in die Agrobakterienzelle gelangen. Ein derartiger Fall ist durchaus denkbar, da als endophytisch lebende Arten auch Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* und *Klebsiella* identifiziert wurden, aus denen die Plasmide der IncP1 $\alpha$ -Subgruppe ursprünglich isoliert wurden (*Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella aerogenes*, Saunders & Grinsted, 1972; Ingram *et al.*, 1973; Pansegrau *et al.*, 1994). Andererseits kommen aufgrund des weiten Wirtsbereichs der IncP1 $\alpha$ -Plasmide auch andere Gattungen als potentieller Plasmid-Donor in Frage.

Falls dieses endogene IncP1 $\alpha$ -Plasmid aus den endophytischen Bakterien in die persistierenden Agrobakterien übertragen wurde, kann dann der binäre Vektor in eine Vielzahl von Bakterien mobilisiert werden.

Geht man von der Funktionsfähigkeit des konjugativen Transfers der binären Plasmide in der Pflanze aus, wird der Übertragungsbereich letztendlich vom „Wirtsbereich“ des *vir*-Systems (DNA-Transfer) ebenso wie vom Wirtsbereich der binären Plasmide (Replikationsbereich) begrenzt.

Der horizontaler Gentransfer durch bakterielle Konjugation auf Endophyten in Pappeln wurde in einer aktuellen Studie nachgewiesen (aus einem *Burkholderia*-Stamm) (Taghavi *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass sich die transferierten Gene in der Endophytengemeinschaft etablieren konnten, während der Donor sich nicht erhalten konnte. Der Gentransfer führte somit zur Veränderung der Eigenschaften der Endophytengemeinschaft (hier Toluenaabbau), ohne dass der Donor in der Lage gewesen ist, sich stabil in der Gemeinschaft zu etablieren.

## 7.2. Transformation

Bei der Transformation handelt es sich um einen Prozess des horizontalen Gentransfers, bei dem freie DNA aus der Umwelt von einer Rezipientenzelle aufgenommen wird. Eine Reihe von Bakteriengattungen sind natürlich transformierbar (kompetent). Bei ihnen ist die von speziellen „Kompetenzgenen“ vermittelte Kompetenz Teil des natürlichen Zellzyklus. Andere Bakterien sind ohne vergleichbare genetische Faktoren über verschiedene Prozeduren künstlich transformierbar. Hierzu gehören u.a. die Behandlung der Bakterienzellen mit Chloriden (z.B.  $\text{CaCl}_2$ ), Chelaten (z.B. EDTA) oder Enzymen (Muraminidasen, Peptidasen). Ebenso sind Bakterienzellen bei Exposition im elektrischen Feld (Elektroporation) bzw. bei Temperaturwechsel (freezing-thawing-Technik) transformierbar. Betrachtet man die diesen Behandlungen teilweise ähnlichen Bedingungen in natürlichen Habitaten, ist vorstellbar, dass neben der natürlichen auch die künstliche (induzierte) Transformation in der Umwelt - etwa im Boden oder innerhalb höherer Organismen – auftreten kann (Lorenz & Wackernagel, 1994).

Abweichend von der induzierten Transformation hängt die natürliche Transformation von mehreren zellulären Funktionen ab. Diese sind an eine koordinierte, durch Umweltfaktoren bestimmte Expression verschiedener chromosomaler Gene gebunden (Dubnau, 1991). Natürlich kompetente Bakterien reagieren mit der Aufnahme fremder DNA somit aktiv auf Umweltveränderungen, was ergänzend zu den anderen DNA-Transferprozessen zur genetischen Anpassung und somit zur Evolution der Prokaryonten beiträgt (Lorenz & Wackernagel, 1994; Dubnau, 1999; Arber, 2000). Vermuten lässt sich damit auch, dass Transformationsereignisse in natürlichen Umwelten wahrscheinlich häufiger über die aktive DNA-Aufnahme als durch passive Induktion stattfinden (Lorenz & Wackernagel, 1994). Hier scheinen insbesondere Mikroökosysteme von Bedeutung zu sein, in denen hohe Zelldichten vorliegen und freie DNA vor Degradation relativ geschützt ist (Trevors *et al.*, 1987).

Zu einer erfolgreichen Transformation gehört neben der DNA-Aufnahme der Einbau in das bakterielle Genom oder die Neubildung eines Plasmids aus den aufgenommenen Bruchstücken. Wie Khasanov *et al.* (1992) nachwiesen, ist dabei die Anzahl an Basenpaaren von homologen Sequenzen entscheidend dafür, wie hoch der Anteil der homologen Rekombination ist. Jedoch kann auch DNA mit geringer oder fehlender Sequenzhomologie integriert werden. In diesem Fall handelt es sich häufig um illegitime, vergleichsweise selten auftretende Rekombinationsereignisse (de Vries *et al.*, 2001; de Vries & Wackernagel, 2002).

Ausgehend von der ökologischen Bedeutung und den verschiedenen Mechanismen der natürlichen Transformation werden nachfolgend natürlich kompetente Vertreter der Prokaryonten vorgestellt sowie Modelle der DNA-Aufnahme und -integration kurz erläutert.

### **7.2.1. Natürlich kompetente Bakterien**

Die natürliche Kompetenz ist eine über zahlreiche taxonomische Gruppen der Eubakterien und darüber hinaus auch in den Archeobakterien verbreitete Eigenschaft (Tabelle 6). Es ist anzunehmen, dass von den natürlich kompetenten Arten nur relativ wenige bekannt sind (Lorenz & Wackernagel, 1994). Die meisten bekannten transformierbaren Bakterien entwickeln mit Ausnahme des konstitutiv kompetenten Pathogens *Neisseria gonorrhoeae* nur eine vorübergehende Kompetenz. Die Transformierbarkeit dieser Arten wird durch unterschiedliche physiologische Faktoren ausgelöst. So beginnt die Kompetenzentwicklung bei *Haemophilus influenzae*, wenn die Zellen in ein bestimmtes wachstumshemmendes Medium überführt werden oder die Zellteilung unter noch günstigen Bedingungen für die Proteinsynthese blockiert ist (Smith *et al.*, 1981). Bei anderen Arten steht die Entwicklung der Kompetenz in Zusammenhang mit den Wachstumsphasen der Zellkulturen. Beispiele hierfür sind die Kompetenz-Maxima während der log-Phase bei *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii* und *Staphylococcus aureus* (Palmen *et al.*, 1992; Page & Sadoff, 1976; Rudin *et al.*, 1974) oder während des Überganges von der log- in die stationäre Phase bei *Bacillus subtilis*, *Metylobacterium organophilum* und *Pseudomonas stutzeri* (Smith *et al.*, 1981; O'Connor *et al.*, 1977; Lorenz & Wackernagel, 1990). Dabei kann der Anteil kompetenter Zellen innerhalb der Kultur unterschiedlich hoch sein – teilweise, wie z. B. bei *Bacillus subtilis* oder *Acinetobacter calcoaceticus* wurden Anteile von 10 und 25% ermittelt (Smith *et al.*, 1981; Palmen *et al.*, 1992) während andere Arten wie *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* fast 100%ig kompetente Kulturen ausbilden (Smith *et al.*, 1981).

Tabelle 6: Natürlich transformierbare prokaryontische Arten (nach Lorenz & Wackernagel, 1994, verändert)

Art (isoliert aus terrestrischem oder aquatischem Habitat)	Taxonomische Gruppe	Transformationsfrequenz* (chromosomaler Marker, Transformanten / lebende Zelle)
<u>Photolithotrophe Arten:</u>		
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	Cyanobacteria	$4,3 \times 10^{-4}$
<i>Anacystis nidulans</i>	Cyanobacteria	$8,0 \times 10^{-4}$
<i>Chlorobium limicola</i>	Chlorobia	$1,0 \times 10^{-5}$
<i>Nostoc muscorum</i>	Cyanobacteria	$1,2 \times 10^{-3}$
<i>Synechocystis</i> sp. strain 6803	Cyanobacteria	$5,0 \times 10^{-4}$
<i>Synechocystis</i> sp. strain OL50	Cyanobacteria	$2,0 \times 10^{-4}$
<u>Chemolithotrophe Arten:</u>		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	$\beta$ -Proteobacteria	$10^{-3} - 10^{-2}$
<i>Thiobacillus</i> sp. strain Y	$\beta$ -Proteobacteria	$1,7 \times 10^{-3}$
<u>Heterotrophe Arten:</u>		
<i>Achromobacter</i> spp.	$\beta$ -Proteobacteria	+ (qualitativer Nachweis)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	$7,0 \times 10^{-3}$
<i>Azotobacter vinelandii</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	$9,5 \times 10^{-2}$
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes	$3,5 \times 10^{-2}$
<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	$1,2 \times 10^{-2}$
<i>Deinococcus (Micrococcus) radiodurans</i>	Deinococcus-Thermus	$2,1 \times 10^{-2}$
<i>Lactobacillus lactis</i>	Firmicutes	$2,3 \times 10^{-5}$
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Actinobacteria	$10^{-7} - 10^{-6}$
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (und verwandte Arten)	$\gamma$ -Proteobacteria	$7,0 \times 10^{-5}$
<i>Rhizobium meliloti</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	$7,0 \times 10^{-4}$
<i>Streptomyces</i> spp.	Actinobacteria	+ (qualitativer Nachweis)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Firmicutes	$2,7 \times 10^{-3}$
<i>Thermus thermophilus</i>	Deinococcus-Thermus	$1,0 \times 10^{-2}$
<i>Thermus flavus</i>	Deinococcus-Thermus	$8,8 \times 10^{-3}$
<i>Thermus caldophilus</i>	Deinococcus-Thermus	$2,7 \times 10^{-3}$
<i>Thermus aquaticus</i>	Deinococcus-Thermus	$6,4 \times 10^{-4}$
<i>Vibrio</i> sp. strain D19	$\gamma$ -Proteobacteria	$2,0 \times 10^{-7}$
<i>Vibrio</i> sp. strain WJT-1C	$\gamma$ -Proteobacteria	$2,5 \times 10^{-4}$
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	$1,9 \times 10^{-9}$
<u>Methyilotrophe Arten:</u>		
<i>Methylobacterium organophilum</i>	$\alpha$ -Proteobacteria	$5,3 \times 10^{-3}$
<u>Archaeobacteria:</u>		
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Archaea	+ (qualitativer Nachweis)
<i>Methanococcus voltae</i>	Archaea	$8,0 \times 10^{-6}$
<u>Klinische Isolate / pathogene Arten:</u>		
<i>Campylobacter jejuni</i>	$\epsilon$ -Proteobacteria	$2,0 \times 10^{-4}$
<i>Campylobacter coli</i>	$\epsilon$ -Proteobacteria	$1,2 \times 10^{-3}$
<i>Haemophilus influenzae</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	$7,0 \times 10^{-3}$
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	$\gamma$ -Proteobacteria	$8,6 \times 10^{-3}$
<i>Helicobacter pylori</i>	$\epsilon$ -Proteobacteria	$5,0 \times 10^{-4}$
<i>Moraxella</i> spp.	$\gamma$ -Proteobacteria	+ (qualitativer Nachweis)

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$\beta$ -Proteobacteria	$1,1 \times 10^{-2}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes	$5,5 \times 10^{-6}$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Firmicutes	$2,9 \times 10^{-2}$
<i>Streptococcus sanguis</i>	Firmicutes	$2,0 \times 10^{-2}$
<i>Streptococcus mutans</i>	Firmicutes	$7,0 \times 10^{-4}$

\* Die Transformationsfrequenz ist von unterschiedlichen Autoren in verschiedensten methodischen Ansätzen ermittelt worden.

### 7.2.2. Modelle der DNA-Aufnahme und -integration

Der Prozess der Transformation verläuft bei grampositiven und gramnegativen Bakterien in den grundlegenden Schritten ähnlich. In beiden Fällen wird die aufzunehmende DNA zunächst an der Zellaußenwand gebunden. Danach wird die DNA fragmentiert und bei den gramnegativen Bakterien in das Periplasma überführt. Letztlich gelangt ein Strang der aufgenommenen DNA in das Zytoplasma, während der zweite Strang abgebaut wird (Dubnau, 1999). Die erhaltene einzelsträngige DNA steht im Anschluss der Rekombination im Wirtsgenom zur Verfügung.

Da die DNA bei den gramnegativen Bakterien neben der Zellwand und der Zellmembran auch die äußere Membran passieren muss, schließt die DNA-Aufnahme hier zusätzliche Schritte ein. Basierend auf diesem und weiteren Unterschieden bei der DNA-Aufnahme und -integration wurden für die Transformation zwei Modelle, das *Streptococcus-Bacillus*-Modell (grampositive Bakterien) und das *Haemophilus-Neisseria*-Modell (gramnegative Bakterien) entwickelt (Lorenz & Wackernagel, 1994; Dubnau, 1999). Diese Modelle eignen sich zur Erklärung prinzipieller Abläufe bei der Transformation. Eine klare Gruppierung der Bakterien erlauben sie hingegen nicht, da mehrere Arten bekannt sind, die verschiedene Merkmale beider Modelle in sich vereint haben (Lorenz & Wackernagel, 1994).

***Streptococcus-Bacillus-Modell.*** Bei *B. subtilis* und *S. pneumoniae* bilden kompetente Zellen sehr schnell Komplexe mit doppelsträngiger DNA aus. Im sauren Milieu bindet *B. subtilis* auch einzelsträngige DNA (Smith *et al.*, 1981). Verschiedene Studien zeigten, dass hierbei DNA aus beliebigen Quellen (z.B. *E. coli*, Phage T7, Plasmide) ohne erkennbare Sequenzpräferenz gebunden wird, wobei  $\sim 50$  (*B. subtilis*) bzw. 30 bis 80 Bindungsstellen (*S. pneumoniae*) pro kompetenter Zelle eingebunden zu sein scheinen (Dubnau, 1991; Smith *et al.*, 1981). Als DNA-Rezeptor fungiert bei *B. subtilis* das eng mit der Zellwand assoziierte Membranprotein ComEA bzw. bei *S. pneumoniae* ein Ortholog dieses Proteins (Inamine & Dubnau, 1995; Provvedi & Dubnau, 1999; Campbell *et al.*, 1998).

Kurz nach der Bindung schneidet eine Nuclease die DNA in der Nähe der Kontaktstelle mit ComEA. Die so neu geformte DNA gelangt nun zum membranassoziierten Transportapparat, über den sie in die Zelle gelangt und einen DNase-resistenten Zustand annimmt. Am DNA-Transport in das Zytoplasma, der u.a. bei Dubnau (1999) ausführlich behandelt wird, sind mehrere, von verschiedenen Kompetenzloci (*ComG*, *ComC*, *ComF*, *ComE*) kodierte Proteine sowie auch der DNA-Rezeptor ComEA beteiligt (Albano *et al.*, 1989; Mohan *et al.*, 1989; Londoño-Vallejo & Dubnau, 1993; Hahn *et al.*, 1993). Eine Schlüsselfunktion spielen hierbei die vom *comG*-Locus codierten Proteine, indem sie in der Zellwand poröse Strukturen für die Passage der DNA ausbilden. Ein Arbeitsmodell geht davon aus, dass der Schnitt der doppelsträngigen DNA über eine Konformationsänderung des Rezeptors ComEA erfolgt, die den Kontakt der DNA mit der Nuklease herstellt. Das einzelsträngige Reaktionsprodukt erhält in gleichem Zug Kontakt mit einem Transporterprotein (ComFA) und die aus der ATP-Hydrolyse frei werdende Energie wird für den Transfer in das Zytoplasma genutzt. Essentiell ist offenbar auch ein weiteres vom *comE*-Operon kodiertes Protein (ComEC), das die für die Passage notwendigen wässrigen Poren in der Membran formiert (Dubnau, 1999).

**Haemophilus-Neisseria-Modell.** *H. influenzae* und *N. gonorrhoeae* nehmen im Unterschied zu vielen grampositiven Bakterien nur homologe DNA der gleichen oder nah verwandter Arten auf. Die Spezifität der DNA-Aufnahme resultiert aus der Erkennung spezifischer DNA-Aufnahmesequenzen durch ein DNA-Rezeptorprotein (Sisco & Smith, 1979; Danner *et al.*, 1982; Elkins *et al.*, 1991). Über die „Erkennungsstellen“ hinaus beeinflussen auch die A+T-Gehalte der flankierenden DNA-Regionen die DNA-Bindung und Aufnahme (Danner *et al.*, 1982). Im Vergleich zum grampositiven Kompetenzsystem sind die ersten Schritte der DNA-Bindung an der Zelloberfläche bei *H. influenzae* und *N. gonorrhoeae* u.a. über den Nachweis des DNA-Rezeptors - möglicherweise durch das schnelle Erreichen des DNase-resistenten Zustandes der DNA - weniger gut charakterisiert. Auffällig bei *H. influenzae* ist die rapide DNA-Aufnahme mit 500 bis 1000 Nukleotiden pro Sekunde, obwohl nur vier bis acht Bindungsstellen pro kompetenter Zellen identifiziert wurden (Kahn & Smith, 1984; Deich & Smith, 1980). Über diese Bindungsstellen tritt die doppelsträngige DNA durch eine Pore in der äußeren Membran in das Periplasma. An diesem Prozess sind zwei Pilus-assoziierte Membranproteine (PilQ, PilC) beteiligt. Ein weiteres Pilin-Protein (Pile) ist offensichtlich für die Passage der DNA durch die Mureinschicht entscheidend. Bisher nicht identifiziert sind die DNA-Rezeptoren und die Nuklease zum Abbau des „nicht gebrauchten“ Einzelstranges. Nach der Passage durch die Mureinschicht wird der intakte DNA-Einzelstrang -wie im grampositiven System- durch eine wässrige Pore in der inneren Membran transportiert. Die

Membranpore wird durch ein Ortholog des Kompetenzproteins ComEC gebildet (Dubnau, 1999).

Wie eingangs erwähnt, lassen sich die natürlich kompetenten Bakterien hinsichtlich der DNA-Bindung und Aufnahme oft nicht eindeutig dem einen oder anderen System zuordnen. Ein Beispiel hierfür ist das auch in der endophytischen Mikroflora vorkommende gramnegative Bakterium *Acinetobacter calcoaceticus*. Abweichend von *H. influenzae* oder *N. gonorrhoeae* ist *A. calcoaceticus* wie viele grampositive Arten in der Lage, DNA beliebiger Herkunft aufzunehmen (Lorenz *et al.*, 1992; Palmen *et al.*, 1993). Daneben konnte auch gezeigt werden, dass bei dieser Art Plasmid-DNA und homologe chromosomale DNA um die Bindung und somit um die Aufnahme konkurrieren, wobei Plasmid-DNA anscheinend über den gleichen Weg wie die homologe DNA aufgenommen wird. Versuche mit denaturierter DNA führten zu keiner Transformation, da einzelsträngige Moleküle offenbar (generell) nicht adsorbiert oder aufgenommen werden (Palmen *et al.*, 1993).

**Integration der DNA in das Genom der Rezipientenzelle.** Bei den beiden Transformationstypen verläuft die Integration der DNA sehr ähnlich. Hat das einzelsträngige DNA-Molekül das Zytoplasma erreicht, kann es über homologe Rekombination in das Rezipientengenom integriert werden. Hierbei kommt es, katalysiert durch das RecA-Protein, zur Formierung eines Heteroduplexes, bei dem ein Strang des Rezipienten durch den korrespondierenden Strang des Donors ersetzt wird. Bei *B. subtilis* werden dabei 70% der aufgenommenen homologen DNA-Fragmente, deren Größe im Mittel bei 8,5 kb liegt, integriert (Dubnau, 1991). Generell viel seltener als homologe DNA wird fremde DNA mit geringer oder fehlender Homologie in das Rezipientenchromosom eingebaut. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Wege identifiziert. Ein Weg basiert auf der Erkennung kurzer spezifischer Nukleotidsequenzen durch Enzyme (Transposasen/Integrasen), die die DNA an diesen Stellen schneiden und einsetzen. Hierbei kann es sich sowohl um die Integration von fremder DNA (z.B. Genkassetten bzw. Integrons) als auch um die Transposition von Fremd-DNA handeln (z.B. konjugative Transposons) (Recchia & Hall, 1995; Salyers *et al.*, 1995). Zum anderen können illegitime Rekombinationen auftreten, bei denen die Fremd-DNA an Stellen mit geringer oder nichtvorhandener Homologie inseriert wird (Ehrlich, 1989). Solche nicht von der Katalyse durch das RecA-Protein abhängenden Ereignisse wurden häufig als intramolekulare Rekombinationen infolge eines Doppelstrangbruches identifiziert. Die illegitime Rekombination (ohne homologe Bereiche) tritt bei *Acinetobacter* mit einer mindestens um den Faktor  $10^9$  verminderten Frequenz auf (de Vries & Wackernagel, 2002).



Heterologe DNA-Fragmente können jedoch in *Acinetobacter* effektiv transformiert werden, wenn sie auf beiden Seiten durch homologe Bereiche begrenzt werden (de Vries *et al.*, 2001; de Vries *et al.*, 2004). Für eine optimale Effizienz sollte die Länge der Homologie (gesamt für beide Seiten) 4 kb oder mehr betragen. Daneben kann eine Transformation auch erfolgen, wenn nur eine Seite Homologien zum Rezipientengenom aufweist (de Vries & Wackernagel, 2002; de Vries *et al.*, 2004). Die DNA-Integration erfolgt hier auf der einen Seite durch homologe Rekombination und auf der anderen durch ein illegitimes Rekombinationsereignis zwischen zwei kurzen Abschnitten (3-8 bp) identischer Sequenzen des Donors und des Rezipienten. Der Frequenz für diese DNA-Integration ist um etwa den Faktor  $10^3$  verringert zur Integration mittels beidseitig homologer Rekombination.

Auch für die Transformation heterologer DNA, die durch einen homologen Abschnitt begrenzt ist, ist die Länge des homologen Bereichs wesentlich. So zeigten de Vries und Wackernagel (2002) in einem Versuchsansatz mit *Acinetobacter*, dass die Transformationsfrequenz durch die Verminderung homologer Nukleotide von ~1100 auf ~300 um das 15fache gesenkt wird und dass bei nur noch 99 identischen Nukleotiden keine Transformation mehr nachweisbar ist. Im Vergleich zur Integration von DNA ohne Homologie ergaben sich jedoch selbst bei wenigen übereinstimmenden Nukleotiden (183 bp) noch um 500fach höhere Transformationsfrequenzen. Die durch geringe Sequenzhomologien mögliche illegitime Rekombination scheint somit die Introgression von DNA in prokaryontische Genome ohne Beteiligung mobiler genetischer Elemente zu erklären.

**Rekonstitution von Plasmid-Molekülen.** Handelt es sich bei der Donor-DNA um ein Plasmid, unterliegt es dem gleichen Aufnahme- und Transportprozess wie lineare bakterielle DNA. Für die ringförmige Plasmid-DNA stellt dies ein besonderes Problem dar, in geeigneter Form ins Zytoplasma zu gelangen, um dort später rezirkuliert zu werden. Die Transformationseffizienz ist so generell erheblich niedriger als bei linearer DNA. Für die Plasmidtransformation in *B. subtilis* muß das Plasmid in multimerischer Form vorliegen (Canosi *et al.*, 1978). Unter dieser Bedingung konnten in *B. subtilis* nach erfolgter Transformation neben einzelsträngiger auch doppelsträngige DNA und teilweise doppelsträngige Plasmide nachgewiesen werden (de Vos *et al.*, 1981). Offenbar ist davon auszugehen, dass die doppelsträngigen Plasmide durch ein Annealing von komplementären Einzelsträngen zweier Donor-Moleküle entstehen (Behnke, 1981; de Vos *et al.*, 1981). Ob sich die Plasmide allerdings in den jeweiligen Bakterien halten bzw. dort repliziert werden, hängt von ihrem Wirtsbereich ab und schränkt somit weiter den Erfolg einer Plasmidtransformation ein.

### **7.2.3. Möglichkeiten der Transformation endophytischer Bakterien mit rekombinanter *Agrobacterium*-DNA**

Der Gentransfer über die Transformation setzt das Vorhandensein einer ausreichenden Menge freier transformierbarer DNA und zur Aufnahme dieser DNA befähigter (kompetenter) Bakterien voraus. Neben den natürlich kompetenten Bakterien können unter bestimmten Umweltbedingungen (z.B. Exposition im elektrischen Feld) auch „normalerweise“ nicht transformierbare Arten DNA aufnehmen, was jedoch in natürlichen Umwelten wie dem Interzellularraum von Pflanzen, dem Lebensbereich der Endophyten, von untergeordneter Bedeutung sein dürfte. Darüber hinaus hängt nach der DNA-Aufnahme der Erfolg der Transformation letztlich davon ab, ob die DNA in das Genom (Chromosom oder Plasmid) der Wirtszelle integriert wird und nach erfolgter Zellteilung erhalten bleibt.

Die endophytischen Bakterien und deren Lebensraum sind bezüglich dieser Voraussetzungen noch sehr wenig untersucht. Insbesondere sind im Gegensatz zum Habitat Boden keine Daten zum Vorkommen und zur Persistenz freier DNA innerhalb der Pflanzen verfügbar. Dennoch ist anzunehmen, dass der Lebensraum der Endophyten ein Umweltmedium ist, das potentielle Möglichkeiten für Transformationsereignisse bietet. Betrachtet man allerdings die Gesamtheit der Bedingungen, die den Erfolg der Transformation beeinflussen, scheint die Wahrscheinlichkeit dieses Transferweges im Vergleich zur Konjugation geringer zu sein:

Der Interzellularraum der Pflanzen scheint ähnlich wie z.B. der Darm von Insekten oder Warmblütern ein natürliches Bakterienhabitat zu sein, in dem gewöhnlich reichliche Mengen hochmolekularer DNA freigesetzt werden (Lorenz & Wackernagel, 1994). Die Freisetzung von DNA könnte vor allem in Regenerationssystemen mit absterbendem Kallusgewebe besonders hoch sein. Hier bzw. im Gewebe der natürlich wachsenden transformierten Pflanze kann rekombinante DNA sowohl aus absterbenden Pflanzenzellen als auch aus den *Agrobakterien* entlassen werden. Konkrete Daten sind hierzu jedoch nicht bekannt.

Die freigesetzte DNA kann durch kompetente endophytische Bakterien aufgenommen werden. Wie unter Abschnitt 5.3 gezeigt, beinhaltet die Endophytenmikroflora in Forstgehölzen auch eine Reihe natürlich kompetenter Bakterien wie *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* und *Pseudomonas*. Unbekannt ist allerdings, inwieweit diese Bakterien innerhalb der Regenerationskulturen und der im Gewächshaus oder Freiland wachsenden Pflanzen eine Transformierbarkeit entwickeln, da sich die in vitro nachgewiesenen Bedingungen für die Ausbildung der Kompetenz der einzelnen Arten nicht auf das System „Pflanze“

übertragen lassen. Möglicherweise stellen die Bedingungen in der Pflanze einen limitierenden Faktor für die Transformierbarkeit der Endophyten dar.

Für die Aufnahme der rekombinanten DNA kommen im wesentlichen nur Bakterienarten in Frage, die in der Lage sind, externe DNA auch ohne Homologie zur eigenen DNA zunächst an ihrer Zelloberfläche zu binden (z.B. *Acinetobacter calcoaceticus*). Dies schränkt die Wahrscheinlichkeit von Transformationsereignissen innerhalb der Endophyten weiter ein. Ein nächster reduzierender Faktor für den Erfolg des Gentransfers besteht darin, dass nicht-homologe Fremd-DNA in das Rezipientengenom nur begrenzt durch homologe Bereiche oder mit Hilfe mobiler genetischer Elemente sowie über illegitime Rekombination integriert werden kann. Da es sich bei der rekombinanten DNA um ein „künstliches“ Konstrukt mit deutlich begrenzten Sequenzhomologien zu natürlichen Bakterien-DNA's handelt, sind die Voraussetzungen für die Integration der DNA zumindest nicht günstig. Würde anstelle von linearer fragmentierter DNA der gesamte binäre Vektor zur Transformation anstehen, müssten zugleich mehrere Einzelstränge des Plasmids den an lineare DNA adaptierten Aufnahme- und Transportprozess in die Zelle soweit unbeschadet „überstehen“, um im Zytoplasma ein neues doppelsträngiges Plasmid auszubilden, dessen Fortbestand ebenso wie nach einer Konjugation von seiner Replizierbarkeit im neuen Wirt abhängen würde.

Der Gentransfer in die endophytischen Bakterien über die Transformation dürfte somit vor allem durch die limitierenden Größen begrenzt sein, die sich zum einen aus der Kompetenzentwicklung und dem Kompetenzsystem der Bakterien und zum andern aus den meist fehlenden homologen Bereichen und der damit verbundenen sehr geringen Frequenz der illegitimen Rekombination bei der Integration der Fremd-DNA ergeben.

## **8. Danksagung**

Wir danken Herrn Dr. Torsten Hoffman und Herrn Dr. Rainer Uhse-Nolte für das kritische Lesen des Manuskripts und die wertvollen Anregungen.

## **9. Literatur**

- Adamczyk, M.; Jagura-Burdzy, G. (2003) Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim. Polonica* 50, 425-453.
- Albano, M.; Breitling, R.; Dubnau, D. (1989) Nucleotide sequence and genetic organization of the *Bacillus subtilis* comG operon. *J. Bacteriol.* 171, 5386-5404.
- Alexander, E.; Pham, D.; Steck, T.R. (1999) The viable but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3754-3756.

- Alt-Mörbe, J.; Stryker, J.L.; Fuqua, C.; Li, P.L.; Farrand, S.K.; Winans, S.C. (1996) The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes. *J. Bacteriol.* 178, 4248-4257.
- An, G.; Watson, B.D.; Stachel, S.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4, 277-284.
- Araujo, W.L.; Marcon, J.; Maccheroni, W. Jr.; van Elsas, J.D.; van Vuurde, J.W.L.; Azevedo, J.L. (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4906-4914.
- Araujo, W.L.; Saridakis, H.O.; Barroso, P.A.V.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Azevedo, J.L. (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47, 229-235.
- Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 1-7.
- Arisi, A.C.M.; Cornic, G.; Jouanin, L.; Foyer, C.H. (1998) Over-expression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO<sub>2</sub> partial pressures following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. *Plant Physiol.* 117, 565-574.
- Bacon, C.W.; Hill, N.S. (1996) Symptomless grass endophytes: production of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of infected grasses, pp. 155-178. In: *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants* (S.C. Redlin & L.M. Carris, eds.), St. Paul, MN, APS Press.
- Bacon, M.; Mead, C.E. (1971) Bacteria in the wood of living aspen, pine and alder. *Northwest Science* 45, 270-275.
- Bailey, J.A.; O'Connell, R.J.; Pring, R.J.; Nash, C. (1992) Infection strategies of *Colletotrichum* species, pp. 88-120. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (J.A. Bailey & M.J. Jeger, eds.), Wallingford, UK, CAB Int.
- Bal, A.S.; Chanway, C.P. Isolation and identification of endophytic bacteria from lodgepole pine and western red cedar. [www.ag.auburn.edu/~mlowens/argentina/pdfmanuscripts/bal.pdf](http://www.ag.auburn.edu/~mlowens/argentina/pdfmanuscripts/bal.pdf).
- Bangera, M.G.; Thomashow, L.S. (1996) Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 83-90.
- Barghchi, M.; Turgut, K.; Scott, R.; Draper, J. (1994) High frequency transformation from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana* ecotypes "C24" and "Landsberg erecta". *Plant Growth Regulation* 14, 61-67.
- Barrett, C.; Cobb, E.; Mc Nicol, R.; Lyon, G. (1997) A risk assessment study of plantgenetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 47, 135-144.
- Barry, G.; Kishore, G.; Padgett, S.; Taylor, M.; Kolacz, K.; Weldon, M.; Re, D.; Eichholtz, D.; Finch, K.; Hallas, L. (1992) Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants, pp. 139-145. In: *Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants*. (B.K. Singh, H.E. Flores, & J.C. Shannon, eds.), Rockville, Md, USA, American Society of Plant Physiologists.
- Bashan, Y.; Holguin, G. (1997) *Azospirillum*-plant relationships : Environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43, 103-121.
- Basile, D.V.; Basile, M.R.; Li, Q.Y.; Corpe, W.A. (1985) Vitamin B12 - stimulated growth and development of *Jungermannia leiantha* Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds.) Dum. (Hepaticae). *Bryologist* 88, 77-81.
- Bates, S.; Cashmore, A.M.; Wilkins, B.M. (1998) IncP Plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of the tra2 mating system. *J. Bacteriol.* 180, 6538-6543.
- Behnke, D. (1981) Plasmid transformation of *Streptococcus sanguis* (Challis) occurs by circular and linear molecules. *Mol. Gen. Genet.* 182, 490-497.
- Beijersbergen, A.; Dulk-Ras, A.D.; Schilerpoort, R.A.; Hooykaas, P.J.J. (1992) Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 256, 1324-1327.
- Bell, C.R.; Dickie, G.A.; Harvey, W.L.G.; Chan, J.W.Y.F. (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41, 46-53.
- Bent, E.; Chanway, C.P. (1998) The growth promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44, 980-988.

- Bent, E.; Chanway, C.P. (2002) Potential for misidentification of a spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4650-4652.
- Berg, G.; Krechel, A.; Ditz, M.; Sikora, R.A.; Ulrich, A.; Hallmann, J. (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 215-229.
- Berger, B.R.; Christie, P.J. (1994) Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176, 3646-3660.
- Bernaerts, M.J.; De Ley, J. (1963) A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 26, 406-407.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nuc. Acids Res.* 12, 8711-8721.
- Björklöf, K.; Sen, R.; Jorgensen, K.S. (2002) Maintenance and impacts on an inoculated *mer/luc*-tagged *Pseudomonas fluorescens* on microbial communities in birch rhizospheres developed on humus and peat. *Microbiol. Ecol.* 45, 39-52.
- Blumer, C.; Haas, D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173, 170-177.
- Bouzar, H.; Chilton, W.S.; Nesme, X.; Dessaux, Y.; Vaudequin, V.; Petit, A.; Jones, J.B.; Hodge, N.C. (1995) A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 65-73.
- Boxus, P.; Terzi, J.M. (1987) Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Hort.* 212, 91-93.
- Boxus, P.; Terzi, J.M. (1988) Control of accidental contaminations during mass propagation. *Acta Hort.* 225, 189-191.
- Braatne, J.H.; Rood, S.B.; Heilman, P.E. (1996) Live history, ecology, and conservation of riparian cottonwoods in North America, pp. 57-85. In: *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation* (R.F. Stettler, H.D. Bradshaw Jr., P.E. Heilman & T.M. Hinckley, eds.), Ottawa, Ontario, Canada, NRC Research Press.
- Brooks, D.S.; Gonzalez, C.F.; Appel, D.N.; Filer, T.H. (1994) Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Biol. Con.* 4, 373-381.
- Buchanan-Wollaston, V.; Passiatore, J. E.; Cannon, F. (1987) The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* 328, 172-175.
- Bundock, P.; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A.; Hooykaas, P.J. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 3206-1324.
- Bundock, P.; Mroczek, K.; Winkler, A.A.; Steensma, H.Y.; Hooykaas, P.J. (1999) T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Genet.* 261, 115-121.
- Burlage, R.S.; Bemis, L.A.; Layton, A.C.; Saylor, G.S.; Larimer, F. (1990) Comparative genetic organization of incompatibility group P degradative plasmids. *J. Bacteriol.* 172, 6818-6825.
- Busow, V.B.; Brunner, A.M.; Meilan, R.; Filichkin, S.; Ganio, L.; Gandhi, S.; Strauss, S.H. (2005) Genetic transformation: A powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. *New Phytol.* 167, 9-18.
- Cabezón, E.; Lanka, E.; de la Cruz, F. (1994) Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the *IncW* plasmid R388: *trwB* and *RP4 traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* 176, 4455-4458.
- Cabezón, E.; Sastre, J.I.; de la Cruz, F. (1997) Genetic evidence of a coupling role for the *TraG* protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* 254, 400-406.
- Cambours, M.A.; Nejad, P.; Granhall, U.; Ramstedt, M. (2005) Frost-related dieback of willows. Comparison of epiphytically and endophytically isolated bacteria from different *Salix* clones, with emphasis on ice nucleation activity, pathogenic properties and seasonal variation. *Biomass and Bioenergy* 28, 15-27.
- Cameron, R.K.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J. (1994) Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 5, 715-725.
- Campbell, E.A.; Choi, S.Y.; Masure, H.R. (1998) A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol. Microbiol.* 27, 929-939.
- Cankar, K.; Kraigher, H.; Ravnkar, M.; Rupnik, M. (2005) Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiol. Letters* 244, 341-345.
- Canosi, U.; Morelli, G.; Trautner, T.A. (1978) The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some *S. aureus* plasmids isolated from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 166, 259-267.
- Cao, L.; Qiu, Z.; You, J.; Tan, H.; Zhou, S. (2005) Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 147-152.

- Carstens, M.; Vivier, M.A.; Pretorius, I.S. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. *Transg. Res.* 12, 497-508.
- Cassells, A. (1997) Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 370 p.
- Cassells, A.C.; Doyle, B.M.; Curry, R.F. (2000) Proceedings of the International Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation. *Acta Hort.* 530 (special edition).
- Castignetti, D.; Smarelli, J. Jr. (1986) Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Lett.* 209, 147-151.
- Chanway, C.P. (1998) Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50, 149-170.
- Chanway, C.P.; Holl, F.B. (1994) Growth of outplanted lodgepole pine seedlings one year after inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. *For. Sci.* 40, 238-246.
- Chelius, M.K.; Triplett, E.W. (2001) The diversity of *Archaea* and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecol.* 41, 252-263.
- Chen, C.Y.; Wang, L.; Winans, S.C. (1991) Characterization of the supervirulent *virG* gene of *A. tumefaciens* plasmid pTiBo542. *Mol. Gen. Genet.* 230, 302-309.
- Christie P.J. (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J. Bacteriol.* 179, 3085-3094.
- Christie, P.J. (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40, 294-305.
- Christie, P.J.; Ward, J. E.S.; Winans, C.; Nester, E.W. (1988) The *Agrobacterium tumefaciens virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J. Bacteriol.* 170, 2659-2667.
- Clewell D.B.; Weaver, K.E. (1989) Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 21, 175-184.
- Confalonieri, M.; Allegro, G.; Balestrazzi, A.; Fogher, C.; Delledonne, M. (1988) Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (KTi3) gene. *Mol. Breed.* 4, 137-145.
- Confalonieri, M.; Belenghi, B.; Belestrazzi, A.; Negri, S.; Facciotto, G.; Schenone, G.; Delledonne, M. (2000) Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. "Villafranca" and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.* 19, 978-982.
- Cook, D.M.; Farrand S. K. (1992) The oriT region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origins of RSF1010 and RK2/RP4 and with T-region borders. *J. Bacteriol.* 174, 6238-6246.
- Cook, D.M.; Li, P.L.; Ruchaud, F.; Padden, S.; Farrand, S.K. (1997) Ti plasmid conjugation is independent of vir: reconstitution of the tra functions from pTiC58 as a binary system. *J. Bacteriol.* 179, 1291-1297.
- Cooke, D.L.; Waites, W.M.; Leifert, C. (1992) Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of Aster, Cheiranthus, Delphinium, Iris and Rosa; disease development *in vivo* as a result of latent infection *in vitro*. *J. Plant Dis. Protection* 99, 469-481.
- Cooley, M.B.; D'Souza, M.R.; Kado, C.I. (1991) The *virC* and *virD* operons of the *Agrobacterium* Ti plasmid are regulated by the *ros* chromosomal gene: Analysis of the cloned *ros* gene. *J. Bacteriol.* 173, 2608-2616.
- Cubero, J.; Lopez, M.M. (2004) *Agrobacterium* persistence in plant tissues after transformation, pp. 351-364. In: *Transgenic Plants. Methods and Protocols* (L. Pena, ed.), Totowa, USA, Humana Press.
- Cubero, J.; Martinez, M.C.; Llop, P.; Lopez, M.M. (1999) A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumors. *J. Appl. Microbiol.* 86, 591-602.
- Dahm, H.; Hryniewicz, K.; Strzelczyk, E.; Wrotniak, W. (2003) Studies on the production of siderophores by forest trees endophytic bacteria and fungi. *Folia Forestalia Polonica* 45, 5-13.
- Danner, D.B.; Smith, H.O.; Narang, S. A. (1982) Construction of DNA recognition sites active in *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2393-2397.
- De Cleene, M.; De Ley, J. (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42, 389-466.
- de Groot, M.J.; Bundock, P.; Hooykaas, P.J.J.; Beijersbergen, A.G. (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16, 839-842.
- de la Cruz, F.; Davies, J. (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8, 128-133.

- de la Cruz, F.; Lanka, F. (1998) Function of the T-plasmid vir proteins: T-complex formation and transfer to the plant cell, pp. 281–301. In: *The Rhizobiaceae* ( H. P. Spaink, A. Kondorosi & P. J. J. Hooykaas, eds.), Dordrecht, The Netherlands, Publishing. Kluwer Academic.
- de Vos, W.M.; Venema, G.; Canosi, U.; Trautner, T.A. (1981) Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: fate of plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 181, 424-433.
- de Vries, J.; Herzfeld, T.; Wackernagel, W. (2004) Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Mol. Microbiol.* 53, 323-334.
- de Vries, J.; Meier, P.; Wackernagel, W. (2001) The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 211-215.
- de Vries, J.; Wackernagel, W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2094-2099.
- De Wit, P.J.G.M.; Spikman, G. (1982) Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 21, 1-11.
- Deblaere, R.; Bytebier, B.; De Greve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Van Montagu, M.; Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nuc. Acids Res.* 13, 4777- 4788.
- Deich, R.A.; Smith, H.O. (1980) Mechanism of homospecific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol. Gen. Genet.* 177, 3693-3674.
- Delledonne, M.; Allegro, G.; Belenghi, B.; Balestrazzi, B.; Picco, F.; Levine, A.; Zelasco, S.; Calligari, P.; Confalonieri, M. (2001) Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor gene and analysis of insect pest resistance. *Mol. Breed.* 7, 35-42.
- Di Fiore, S.; Del Gallo, M. (1995). Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. pp. 169-187. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms (I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden & M. De Zamaroczy, eds.), Berlin, Springer Verlag.
- Ditta, G.; Stanfield, S.; Corbin, D.; Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gramnegative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7347 -7351.
- Dixon, R. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Dominguez, A.; Cervera, M.; Perez, R.M.; Romero, J.; Fagoaga, C.; Cubero, J.; Lopez, M.M.; Juarez, J.A.; Navarro, L.; Pena, L. (2004) Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol. Breed.* 14, 171-183.
- Dominguez, A.; de Mendoza, A.H.; Guerri, J.; Camba, M.; Navarro, L.; Moreno, P.; Pena, L. (2002) Pathogen derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Mol. Breed.* 10, 1-10.
- Donahue, R.A.; Davis, T.D.; Michler, C.H.; Riemenschneider, D.E.; Carter, D.R.; Marquardt, P.E.; Sankhla, D.; Haissig, B.E.; Isebrands, J.G. (1994) Growth, photosynthesis, and herbicide tolerance of genetically modified hybrid poplar. *Can. J. For. Res.* 21, 1155-1170.
- Dong, I.-C.; Sun, C.-W.; Thies, K.L.; Luthe, D.S.; Graves, J.C.H. (1992) Use of polymerase chain reaction to detect phytopathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathol.* 82, 434-439.
- Döring, D.; Ewald, D.; Müller, M. (2005) Intracellular occurrence of bacteria in root hairs of *Eleutherococcus sieboldianus* (Makino) Koidz. Plantlets. Phillips-Universität Marburg, 6.-8.4.2005 (Poster). [http://staff-www.uni-marburg.de/~b\\_morpho/doeringposter.pdf](http://staff-www.uni-marburg.de/~b_morpho/doeringposter.pdf)
- Doty, S.L.; Wilson, A.; Lie, T.; Moore, A.; Leigh, J.; Heilman, P.; Strand, S.; Gordon, M. (2002) Discovery of an endophytic *Rhizobium* of poplar trees Poster, <http://abstracts.aspb.org/pb2002/public/P60/0425.html>
- Doty, S.L.; Shang, T.Q.; Wilson, A.M.; Tangen, J.; Westergreen, A.D.; Newman, L.A.; Strand, S.E.; Gordon, M.P. (2000) Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6287-6291.
- Dowler, W.M.; Weaver, D.J. (1975) Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. *Phytopathol.* 65, 233-236.
- Dubnau, D. (1991) Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55, 395–424.
- Dubnau, D. (1999) DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 217-44.

- Dumas, F.; Duckely, M.; Pelczar, P.; Van Gelder, P.; Hohn, B. (2001) An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 485-490.
- Dürrenberger, F.; Cramer, A.; Hohn, B.; Koukolikova-Nicola Z. (1989) Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 9154-9158.
- Eckert, M.; Maguire, M.K.; Urban, M.; Foster, S.; Fitt, B.; Lucas, J.; Hammond-Kosack, K. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp*. FEMS Microbiol. Lett. 253, 67-74.
- Egea-Cortines, M.; Weiss, J. (2001) A rapid coming age in tree biotechnology. Nature Biotechnol. 19, 215-216.
- Ehrlich, S.D. (1989) Illegitimate recombination in bacteria. Pp. 799-824. In: Mobile DNA (D.E. Berg & M.M. Howe, eds.), Washington, D.C, Am. Soc. Microbiol.
- Elkins, C.; Thomas, C.E.; Seifert, H.S.; Sparling, P.F. (1991) Species-specific uptake of DNA by *gonococci* is mediated by a 10-base-pair sequence. J. Bacteriol. 173, 3911-3913.
- Ellis, D.D.; McCabe, D.E.; McInnis, S.; Ramachandran, R.; Russell, D.R.; Wallace, K.M.; Martinell, B.J.; Roberts, D.R.; Raffa, K.F.; McCown, B.H. (1993) Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Bio/Technology 11, 84-89.
- Eriksson, M.E.; Israelsson, M.; Olsson, O.; Moritz, T. (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. Nature Biotechnol. 18, 784 – 788.
- Ewald, D.; Han, Y. (1999) Freisetzungsversuche mit transgenen Pappeln in China. In: Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven. Fachgespräch am 20./21.9.1999, Humboldt- Universität zu Berlin, Umweltbundesamt (Hrsg.), ISSN 0722-186X, S. 57-61.
- Ewald, D.; Naujoks, G.; Zaspel, I.; Szczygiel, K. (1997) Occurrence and influence of endogenous bacteria in embryogenic cultures of Norway spruce. pp. 149-154. In: Pathogen and microbial contamination management in micropropagation (A.C. Cassells, ed.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Ewald, D.; Yang, M.S.; Zaspel, I. (2003) Untersuchungen zur Persistenz von Bakterien in transgenen Pappeln. BFH-Nachrichten, 41, 8. (Online-Version).
- Ewald, D.; Zaspel, I.; Naujoks, G.; Behrendt, U. (2000) Endogenous bacteria in tissue cultures of conifers – appearance and action, pp. 137-145. In: Proceedings of the Int. Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation (A.C. Cassells, B.M. Doyle & R.F. Curry, eds.), Acta Hort. 530.
- Faize, M.; Malnoy, M.; Dupuis, F.; Chevalier, M.; Parisi, L.; Chevreau, E. (2003) Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple. Phytopathol. 93, 1496-1504.
- Fan, J.; Han, Y.; Li, L.; Peng, X.; Li, J. (2002) Studies on transformation of *mtiD/guD* divalent genes to *Populus deltoides* x *P. cathayana*. Sci. Silv. Sin., 38, 30-35.
- Farrand, S.K. (1989) Conjugal transfer of bacterial genes on plants, pp. 261-286. In: Gene transfer in the environment (Levy, S.B. & Miller, R.V., eds.), New York. McGraw-Hill, Inc.
- Farrand, S.K.; Hwang, I.; Cook, D.M. (1996) The *tra* region of the nopaline-type Ti plasmid is a chimera with elements related to the transfer systems of RSF1010, RP4, and F. J. Bacteriol. 178, 4233-4247.
- Fenning, T.; Gershenson, J. (2002) Where will the wood come from? Plantation forest and the role of biotechnology. Trends Biotechnol. 20, 291-296.
- Ferreira, S.A.; Pitz, K.Y.; Manshardt, R.; Zee, F.; Fitch, M.; Gonsalves, D. (2002) Virus coat protein transgenic papaya provides practical control of papaya ringspot virus in Hawaii. Plant Dis. 86, 101-105.
- Fillati, J.J.; Sellmer, J.; McCown, B.; Haissig, B.; Comai, L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206, 192-199.
- Firth, N.; Ippen-Ihler, K.; Skurray, R.A. (1996) Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. pp. 2377-2401. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, (F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter & H.C. Umberger, eds.), Washington, D.C, 2<sup>nd</sup> ed. American Society for Microbiology.
- Fladung, M. (1998) Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. Vorträge Pflanzenzüchtung 43, 124-133.
- Fladung, M. (1999) Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). Flanking DNA sequences and T-DNA structure. Mol. Gen. Genet. 260, 574-581.
- Fladung, M.; Ewald, D. (2003) *Quo vadis* Gentechnik? pp. 123-129. In: Holzbiologische, -chemische, -technologische und phytopathologische Untersuchungen an *rolC*-transgenen Hybridaspens (*P. tremula*



- L.x *P. tremuloides* Michx.) aus einem Freisetzungsvorversuch. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg 214.
- Fladung, M.; Ewald, D. (2006) Recent development in tree transgenesis. Springer Verlag. In Druck.
- Fladung, M.; Scholz, F. (2003) Sicherheitsforschung an gentechnisch veränderten Bäumen. pp. 1-8. In: Holzbiologische, -chemische, -technologische und phytopathologische Untersuchungen an *rolC*-transgenen Hybridaspen (*P. tremula* L.x *P. tremuloides* Michx.) aus einem Freisetzungsvorversuch. Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft Hamburg 214.
- Foyer, C.H.; Souriau, N.; Perret, S.; Lelandais, M.; Kunert, K.J.; Pruvost, C.; Jouanin, L. (1995) Over-expression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* 109, 1047-1057.
- Franche, C.; Diouf, D.; Le, Q.V.; Bogusz, A.; N'Diaye, H.; Gherbi, H.; Duhoux, E. (1997) Genetic transformation of *Allocasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.* 11, 897-940.
- Frisch, D.A.; Harris-Haller, L.W.; Yokubaitis, N.T.; Thomas, T.L.; Hardin, S.H.; Hall, T.C. (1995) Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.* 27, 405-9.
- Frommel, M.I.; Nowak, J.; Lazarovits, G. (1991) Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96, 928-936.
- Fullner, K.J.; Lara, J.C.; Nester, E.W. (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science* 273, 1107-1109.
- Fullner, K.J.; Nester, E.W. (1996) Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 178, 1498-1504.
- Garbeva, P.; van Overbeek, L.S.; van Vuurde, J.W.L.; van Elsas, J.D. (2001) Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.* 41, 369-383.
- Gardner, J.M.; Chandler, J.L.; Feldman, A.W. (1984) Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant and Soil* 77, 103-113.
- Gardner, J.M.; Feldman, A.W.; Zablotowicz, R.M. (1982) Identity and behaviour of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1335-1342.
- Gartland, J.S.; Brasier, C.M.; Fenning, T.M.; Birch, R.; Gartland, K.M.A. (2001) Ri-Plasmid mediated transformation and regeneration of *Ulmus procera* (Engl. Elm). *Plant Growth Regulation* 33, 123-129.
- Gartland, K.M.A.; Crow, R.M.; Fenning, T.M.; Gartland, J.S. (2003) Genetically modified trees: production, properties, and potential. *J. Arboricult.* 29, 259-266.
- Germaine, K.; Keogh, E.; Garcia-Cabellos, G.; Borremans, B.; van der Lelie, D.; Barac, T.; Oeyen, L.; Vangronsveld, J.; Porteous Moore, F.; Moore, E.R.B.; Campbell, C.D.; Ryan, D.; Dowling, D.N. (2004) Colonization of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 109-118.
- Ghai, J.; Das, A. (1998) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3109-3113.
- Gillis, M.; Kersters, K.; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt, R.M.; Stephan, M.P.; Teixeira, K.R.S.; Döbereiner, J.; De Ley, J. (1998) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Internat. J. System. Bacteriol.* 39, 361-364.
- Giorcelli, A.; Sparvoli, F.; Fulvio, M.Y.; Tava, A.; Balestrazzi, A.; Vrhovsek, U.; Calligari, P.; Bollini, R.; Confalonieri, M. (2004) Expression of the stilbene synthase (*StSy*) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transg. Res.* 13, 203-214.
- Glick, B.R.; Jacobson, C.B.; Schwarze, M.K.; Pasternak, J.J. (1994) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* 40, 911-915.
- Gordon, M.P.; Choe, N.; Duffi, J.; Ekuon, G.; Heilman, P.; Muiznieks, I.; Ruszaj, M.; Shurtleff, B.B.; Strand, S.; Wilmoth, J.; Newman, L.A. (1998) Phytoremediation of trichlorethylene with hybrid poplars. *Environ. Health Persp.* 106, 1001-1004.
- Gotz, A.; Pukall, R.; Smit, E.; Tietze, E.; Prager, R.; Tschape, H.; van Elsas, J.D.; Smalla, K. (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2621-2628.

- Grahn, A.M.; Haase, J.; Bamford, D.H.; Lanka, E. (2000) Components of the RP4 conjugative transfer apparatus form an envelope structure bridging inner and outer membranes of donor cells: implications for related macromolecule transport systems. *J. Bacteriol.* 182, 1564-1574.
- Graser, E. (1994) Eliminierung von Agrobakterien aus gentechnisch veränderten Pflanzen. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- Grohmann, E.; Muth, G.; Espinosa, M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 277-301.
- Gross, H.J.; Krupp, G.; Domdey, H.; Raba, M.; Jank, P.; Lossow, C.; Alberty, H.; Ramm, K.; Sanger, H.L. (1982) Nucleotide sequence and secondary sequence of citrus exocortis viroid and *chrysanthemum stunt viroid*. *Eur. J. Biochem.* 121, 249-257.
- Grover, A.; Gowthaman, R. (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Curr. Sci.* 84, 330-340.
- Haas, D.; Reimann, C. (1989) Use of Inc-P plasmids in chromosomal genetics of gram-negative bacteria, pp. 185-206. In: *Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria* (C.M. Thomas, ed.), London, Academic Press Inc.
- Haas, J.H.; Moore, L.W.; Ream, W.; Manulis, S. (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2879-2884.
- Haas, L. (2001) Grüne Gentechnik / Spezialisten arbeiten daran, Bäume nach Mass zu optimieren - Wälder auf Trimpfad. *Rheinischer Merkur*, 19.01.2001
- Haase, J.; Lanka E. (1997) A specific protease encoded by the conjugative DNA transfer systems of IncP and Ti plasmids is essential for pilus synthesis. *J. Bacteriol.* 179, 5728-35.
- Haase, J.; Lurz, R.; Grahn, A.M.; Bamford, D.H.; Lanka, E. (1995) Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J. Bacteriol.* 177, 4779-4791.
- Hackland, A.F.; Rybicki, E.P.; Thomson, J.A. (1994) coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.* 139, 1-22.
- Hahn, J.; Inamine, G.; Kozlov, Y.; Dubnau, D. (1993) Characterization of comE, a late competence operon of *Bacillus subtilis* required for the binding and uptake of transforming DNA. *Mol. Microbiol.* 10, 99-111.
- Hajdukiewicz, P.; Svab, Z.; Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-94.
- Hall, T.J.; Schreiber, L.R.; Leben, C. (1986) Effects of xylem-colonizing *Bacillus spp.* on *Verticillium* wilt in maples. *Plant Dis.* 70, 521-524.
- Hallmann, J.; Kloepper, J.W.; Rodriguez-Kabana, R. (1997a) Application of Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. *Can. J. Microbiol.* 43, 411-416.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895-914.
- Hamill, J.D., Rounsley, S., Spencer, A., Todd, G. and Rhodes, M.J.C. (1991). The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Reports* 10, 221-224.
- Hamilton, C.M.; Frary, F.; Lewis, C.; Tanksley, S.D. (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9975-9979.
- Hamilton, C.M.; Lee, H.; Li, P.L.; Cook, D.M.; Piper, K.R.; von Bodman, S.B.; Lanka, E.; Ream, W.; Farrand, S.K. (2000) TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* 182, 1541-1548.
- Hayward, A.C.; Waterston, J.M. (1965) *Corynebacterium flaccumfaciens*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 43 CAB International. Wallingford, U.K.
- Hebbar, K.P.; Davey, A.G.; Merrin, J.; Dart, P.J. (1992) Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. *Soil Biol. Biochem.* 24, 989-997.
- Heinemann, J. A.; Sprague, G.F. Jr. (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340, 205-209.
- Hellens, R.; Mullineaux, P.; Klee, H. (2000a) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5, 446-451.
- Hellens, R.P.; Edwards, E.A.; Leyland, N.R.; Bean, S.; Mullineaux, P.M. (2000b) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819-32.

- Herschbach, C.; Kopriva, S. (2002) Transgenic trees as tools in tree and plant physiology. *Trees* 16, 250-261.
- Hoekema, A.; Hirsch, P.R.; Hooykaas, P.J.J.; Schlerport, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens*-Ti plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- Hohtola, A. (1988) Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 15, 211-222.
- Holland, M.A. (1997): Occams razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiol.* 115, 865-868.
- Holland, M.A.; Polacco, J.C. (1994) PPFMs and other covert contamination: is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 197-209.
- Holsters, M.; Silva, B.; Van Vliet, F.; Genetello, C.; De Block, M.; Dhaese, P.; Depicker, A.; Inze, D.; Engler, G.; Villarroel, R. (1980) The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3, 212-230.
- Hood, E.E.; Gelvin, S.B.; Melchers, L.S.; Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transg. Res.* 2, 208–218.
- Hood, E.E.; Helmer, G.L.; Fraley, R.T.; Chilton, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291-1301.
- Hooykaas, P.J.; Klapwijk, P.M.; Nuti, M.P.; Schilperoort, R.A.; Rorsch, A. (1977) Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to explanta. *J. Gen. Microbiol.* 98, 477- 484.
- Hu, W.J.; Harding, S.A.; Lung, J.; Popko, J.L.; Ralph, J.; Stokke, D.D.; Tsai, C.J.; Chiang, V.L. (1999) Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat Biotechnol.* 17, 808-812.
- Hurek, T.; Reinhold-Hurek, B.; Van Montagu, M.; Kellenberger, E. (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus sp.* strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176, 1913-1923.
- Inamine, G.S.; Dubnau, D. (1995) ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J. Bacteriol.* 177, 3045-3051.
- Ingram, L.C.; Richmond, M. H.; Sykes, R.B. (1973) Molecular characterization of the R factors implicated in the carbenicillin resistance of a sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burns. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 279-288.
- Jacobs, M.J.; Bugbee, W.M.; Gabrielson, D.A. (1985) Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can. J. Bot.* 63, 1262-1265.
- Jäger, J.; Lorenz, D.; Plapp, R.; Eichhorn, K.W. (1990) Latent occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* Biovar3 in grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Wein-Wissen* 45, 14-20.
- James, K.; Olivares, F.L. (1997) Infection and colonization of sugar cane and other Gramineaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 77-119.
- Janyce, A.; Sugui, Y.C.C.; Kwon-Chung, K.J. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.* 71,1798–1802.
- Jimenez-Salgado, T.; Fuentes-Ramirez, L.E.; Tapia-Hernandez, A.; Mascarua-Esparza, M.A.; Martinez-Romero, E.; Caballero-Mellado, J. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3676-3683.
- Jing, Z.P.; Gallardo, F.; Pascual, M.B.; Sampalo, R.; Romero, J.; de Navarra, A.T.; Canovas, F.M. (2004) Improved growth in a field trial of transgenic hybrid poplar overexpressing glutamine synthetase. *New Phytol.* 164, 137-145.
- Jones, J.D.; Shlumukov, L.; Carland, F.; English, J.; Scofield, S.R.; Bishop, G.J.; Harrison, K. (1992) Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transg. Res.* 6, 285-97.
- Jouanin, L.; Goujon, T.; de Nadai, V.; Martin, M.T.; Mila, I.; Vallet, C.; Pollet, B.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Petit-Conil, M.; Lapierre, C. (2000) Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiol.* 123, 1363-1374.
- Ka, J.O.; Tiedje J.M. (1994) Integration und excision of a 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* und evidence of its natural intergeneric transfer. *J. Bacteriol.* 176, 5284-5289.
- Kado, C.I. (1992) Plant pathogenic bacteria, pp. 660-662. In: *The Prokaryotes* (A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer, eds.), New York, Springer-Verlag.
- Kahn, M.E.; Smith, H.O. (1984) Transformation in *Haemophilus*: a problem in membrane biology. *J. Membr. Biol.* 81, 89-103.

- Kamoun, R.; Lepoivre, P.; Boxus, P. (1998) Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus cerasus* cv. "Montmorency". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 52, 57-59.
- Kende, H.; Zeevaart, J.A.D. (1997) The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* 9, 1197-1210.
- Kerr, A.; Ellis, J.G. (1982) Conjugation and transfer of Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*, pp. 321-344. In: *Molecular biology of plant tumors* (G.Kahl & J.S. Schell, eds.), New York, Academic press, Inc.
- Khasanov, F.K.; Zvingila, D.J.; Zainullin, A.A.; Prozorov, A.A.; Bashikirov, V.I. (1992) Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* required approximately 70 bp of homology. *Mol. Gen. Genet.* 243, 494-497.
- Knauth, S.; Hurek, T.; Brar, D.; Reinhold-Hurek, B. (2005) Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 7, 1725-1733.
- Knutson, D.M. (1973) The bacteria in sapwood, wetwood, and heartwood of trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Can. J. Botany* 51, 498-500.
- Kobayashi, D.Y.; Palumbo, J.D. (2000) Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, pp. 199-233. In: *Microbial endophytes* (C.W. Bacon & J.F. White, eds.), New York, Marcel Dekker, Inc.
- Koncz, C.; Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Krause, S.; Barcena, M.; Pansegrau, W.; Lurz, R.; Carazo, J.M.; Lanka, E. (2000) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjugative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3067-3072.
- Kukkurainen, S.; Leino, A.; Vähämiko, S.; Kärkkäinen, H.R.; Ahanen, K.; Sorvari, S. (2005) Occurrence and location of endophytic bacteria in Garden and wild strawberry. *Hort. Science* 40, 348-353.
- Kuklinsky-Sobral, J.; Araújo, W.L.; Mendes, R.; Geraldi, O.I.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6, 1244-1251.
- Kumar, R.B.; Das, A. (2002) Polar location and functional domains of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirD4. *Mol. Microbiol.* 43, 1523-32.
- Kumar, S.; Fladung, M. (2001) Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta* 213, 731-740.
- Kunik, T.; Tzfira, T.; Kapulnik, Y.; Gafni, Y.; Dingwall, C.; Citovsky, V. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1871-1876.
- Lamb, T.G.; Tonkyn, D.W.; Kluepfel, D.A. (1996) Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.* 42, 1112-1120.
- Lambert, B.; Joos, H. (1989) Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends Biotechnol.* 7, 215-219.
- Lambert, C.; Bianco, J.; Garello, G.; Le Page-Degivry, M.-T. (1998) Alteration of hormonal levels and hormone sensitivity by Ri T-DNA transformation of apple cuttings. *J. Plant Physiol.* 153, 677-683.
- Landsmann, J.; Graser, E.; Riedel-Preuß, A.; van der Hoeven, C. (1995) Experiments to eliminate agrobacteria persisting in plants. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 47, 240-244.
- Lapierre, C.; Pollet, B.; Petit-Conil, M.; Toval, G.; Romero, J.; Pilate, G.; Leple, J.C.; Boerjan, W.; Ferret, V.; De Nadai, V.; Jouanin, L. (1999) Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.* 119, 153-163.
- Laukkanen, H.; Soini, H.; Kontunen-Soppela, S.; Hohtola, A.; Viljanen, M. (2000) A *mycobacterium* isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scot pine seedlings. *Tree Physiol.* 20, 915-920.
- Lazarovits, G.; Nowak, J. (1997) Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Hort. Science* 32, 188-192.
- Lazo, G.R.; Stein, P.A.; Ludwig, R.A. (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnol.* 9, 963-967.
- Leben, C.; Daft, G.C.; Schmitthenner, A.F. (1968) Bacterial blight of soybeans: population levels of *Pseudomonas glycinea* in relation to symptom development. *Phytopathol.* 58, 1143-1146.

- Legard, D.E.; McQuilken, M.P.; Whipps, J.M.; Fenlon, J.S.; Fermor, T.R.; Thompson, I.P.; Bailey, M.J.; Lynch, J.M. (1994) Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. *Agric. Environ.* 50, 87-101.
- Lehoczy, J. (1968) Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection. *Phytopathol. Z.* 63, 239-246.
- Leifert, C. (2000) Quality assurance systems for plant cell and tissue culture: the problem of latent persistence of bacterial pathogens and *Agrobacterium*-based transformation vector systems. *Acta Hort.* 530, 87-91.
- Leifert, C.; Camotta, H.; Wright, S.M.; Cheyne, V.A.; Waites, W.M. (1991) Elimination of bacteria from micropropagated plant cultures using antibiotics. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 307-330.
- Leifert, C.; Cassells, A.C. (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37, 133-138.
- Leifert, C.; Morris, C.E.; Waites, W.M. (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems *in vitro*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 139-183.
- Leifert, C.; Waites, W.M.; Nicholas, J.R. (1989) Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 353-361.
- Leple, J.C.; Bonadebottino, M.; Augustin, S.; Pilate, G.; Letan, V.D.; Delplanque, A.; Cornu, D.; Jouanin, L. (1995) Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.* 1, 319-328.
- Lessl, M.; Pansegrau, W.; Lanka, E. (1992) Relationship of DNA-transfer-systems: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences. *Nuc. Acids Res.* 20, 6099-6100.
- Levanony, H.; Bashan, Y.; Romano, B.; Klein, E. (1989) Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasiliense* Cd on and within wheat root by immunogold labeling. *Plant Soil* 117, 207-218.
- Li, L.; Zhou, Y.; Cheng, X.; Sun, J.; Marita, J.M.; Ralph, J.; Chiang, V.L. (2003) Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4939-4944.
- Li, M.L.; Han, Y.F.; Qiu, D.Y.; Li, L.; Tian, Y.C. (1999) Cloning of ACC-oxidase gene and its inhibition of ethylene synthesis by its antisense RNA in transgenic poplar. *Forest Res.* 12, 223-229.
- Li, P.L.; Dawn, M. E.; Farrand, S.K. (1998) Genetic and sequence analysis of the pTiC58 trb Locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* 180, 6164-6172.
- Liang, H.; Maynard, C.A.; Allen, R.D.; Powell, W.A. (2001) Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. *Plant Mol. Biol.* 45, 619-629.
- Liang, H.Y.; Catranis, C.M.; Maynard, C.A.; Powell, W.A. (2002) Enhanced resistance to the poplar fungal pathogen, *Septoria musiva*, in hybrid poplar clones transformed with genes encoding antimicrobial peptides. *Biotechnol. Lett.* 24, 383-389.
- Lin, S. (2001) Cold acclimation of freezing resistance of *Populus tomentosa* and identification of antifreeze protein in *Populus suaveolens*. Beijing Forestry University, China, 110 pp. (Ph.D. thesis)
- Lin, S.; Xiao, J.; Zhang, Z. (2000) Development in resistance gene engineering researches of poplars. *J. Beijing For. Univ.* 22, 85-88.
- Liu, F.; Sun, Z.; Cui, D.; Du, B.; Wang, C.; Chen, S. (2000) Cloning of *E.coli mtlD* gene and its expression in transgenic balizhuangyang (*Populus*). *Acta Genet. Sin.* 27, 428-433.
- Liu, L.; Klopper, J.W.; Tuzun, S. (1995) Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* 85, 843-847.
- Liu, W.; Marsh, T.L.; Cheng, H.; Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
- Llosa, M.; Gomis-Ruth, F.X.; Coll, M.; de la Cruz, F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* 45, 1-8.
- Lodewyckx, C.; Vangronsveld, J.; Porteous, F.; Moore, E.R.B.; Taghavi, S.; van der Lelie, D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 583-606.
- Londoño-Vallejo, J.A.; Dubnau, D. (1993) *ComF*, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Mol. Microbiol.* 9, 119-131.
- Londoño-Vallejo, J.A.; Dubnau, D. (1994) Mutation of the putative nucleotide binding site of the *Bacillus subtilis* membrane protein ComFA abolishes the uptake of DNA during transformation. *J. Bacteriol.* 176, 4642-4645.

- Lorenz, M.G.; Reipschlagel, K.; Wackernagel, W. (1992) Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. Arch. Microbiol. 157, 355-360.
- Lorenz, M.G.; Wackernagel, W. (1990) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. Arch. Microbiol, 154, 380-385.
- Lorenz, M.G.; Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58, 563-602.
- Lyons, N.F.; Taylor, J.D. (1990) Serological detection and identification of bacteria from plants by the conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. Plant Pathol. 39, 584-590.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Senthilkumar, M.; Seshadri, S.; Chung, H.; Yang, J.; Sundaram, S.; Sa, T. (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium spp.* Bot. Bull. Acad. Sin. 45, 315-324.
- Maes, M.; Crepel, C.; Werbrouck, S.; Debergh, P. (1998) Perspectives for a DNA-based detection of bacterial contamination in micropropagated plant tissue. Plant Tissue Culture and Biotechnology 4, 49-56.
- Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W. (1997) Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). Microb. Ecol. 34, 210-223.
- Maloney, A.P.; Vanetten, H.D. (1994) A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin-detoxifying enzyme pisatin demethylase defines a new cytochrome P450 family. Mol. Gen. Genet. 243, 506-514.
- Manahan, S.H.; Steck, T.R. (1997) The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. FEMS Microbiol. Ecol. 22, 29-37.
- Marti, R.; Cubero, J.; Daza, A. (1999) Evidence of migration and endophytic presence of *Agrobacterium tumefaciens* in rose plants. Eur. J. Plant Pathol. 105, 39-50.
- Martineau, B.; Voelker, T.A.; Sanders, R.A. (1994) On Defining T-DNA. Plant Cell 6, 1032-1033.
- Matzk, A. (1998): Persistenz von *Agrobacterium tumefaciens* in transgenen Pflanzen. Dissertation, Erfurt ISBN 3-89720-193-3.
- Matzk, A.; Mantell, S.; Schiemann, J. (1996) Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 9, 373-381.
- McBride, K.E.; Summerfelt, K.R. (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Plant Mol. Biol. 14, 269-76.
- McCrown, B.H.; McCabe, D.E.; Russel, D.R.; Robison, D.J.; Barton, K.A.; Raffa, K.F. (1991) Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. Plant Cell Rep. 9, 590-595.
- McFadden, G.I. (1991) *In situ* hybridization techniques: molecular cytology goes ultrastructural, pp. 219-255. In: Electron microscopy of plant cells (J.L. Hall & C. Hawes, eds.), London, Academic Press.
- McInroy, J.A.; Kloepper, J.W. (1994) Novel bacterial taxa inhabitation internal tissue of sweet corn and cotton. p. 190. In: Improving Plant Production with Rhizosphere bacteria. (M.H. Ryder, P.M. Stephens & G.D. Bowen, eds.), Melbourne, Australia, CSIRO.
- McInroy, J.A.; Kloepper, J.W. (1995) Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. Can. J. Microbiol. 41, 895-901.
- Meilan, R.; Brunner, A.M.; Skinner, J.S.; Strauss, S.H. (2001) Modification of flowering in transgenic trees, pp. 247-256. In: Molecular Breeding of Woody Plants (A. Komamine & N. Morohoshi, eds.), Progress in Biotechnology Series. Amsterdam, the Netherlands, Elsevier Science.
- Meilan, R.; Han, K.-H.; Ma, C.; DiFazio, S.P.; Eaton, J.A.; Hoiem, E.A.; Stanton, B.J.; Crockett, R.P.; Taylor, M.L.; James, R.R.; Skinner, J.S.; Jouanin, L.; Pilate, G.; Strauss S.H. (2002) The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup® herbicide in field-grown hybrid poplars. Can. J. For. Res. 32, 967-976.
- Mengoni, A.; Mocali, S.; Surico, G.; Tegli, S.; Fani, R. (2003) Fluctuation of endophytic bacteria and phytoplasmosis in elm trees. Microbiol. Res. 158, 363-369.
- Mergeay M.; Lejeune, A.; Sadouk, A.; Gerits, J.; Charles, P.; van Gijsegem, F. (1987) Shuttle transfer (or retrotransfer) of chromosomal markers mediated by plasmid pULB113. Mol. Gen. Genet. 209, 61-70.
- Miranda Brasileiro, A.C.; Tourneur, C.; Leple, J.C.; Combes, V.; Jouanin, L. (1992) Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. Transg. Res. 1, 133-141.
- Misaghi, I.J.; Donndelinger, C.R. (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathol. 80, 808-811.

- Misko, A.M.; Germida, J.J. (2002) Taxonomic and functional diversity of Pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 399-407.
- Mocali, S.; Bertelli, E.; Di Cello, F.; Mengoni, A.; Sfalanga, A.; Viliani, F.; Caciotti, A.; Tegli, S.; Surico, G.; Fani, R. (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissue during different seasons and from different plant organs. *Res. Microbiol.* 154, 105-114.
- Mogilner, N.; Zutra, D.; Gafny, R.; Bar-Joseph, M. (1993) The persistence of engineered *Agrobacterium tumefaciens* in agroinfected plants. *Mol. Plant.-Microbe Interact.* 6, 673-675.
- Mohan, S.; Aghion, J.; Guillen, N.; Dubnau, D. (1989) Molecular cloning and characterization of *comC*, a late competence gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171, 6043-6051.
- Monier, C.; Bossis, E.; Chabanet, C.; Samson, R. (1998) Different bacteria can enhance the micropropagation response of *Cotoneaster lacteus* (Rosaceae). *J. Appl. Microbiol.* 85, 1047-1055.
- Murach, D.; Hagemann, H. (2003) Energieholz und Energiewälder in Brandenburg, Teil 1. *Brandenburgische Forstnachrichten* 104, 12-13.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Muyzer, G.; de Waal, D.C.; Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Naujoks, G.; Zaspel, I.; Behrendt, U. (2000) Microorganisms acting in tissue cultures of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), pp. 129-135. In: *Proceedings of the Int. Symposium on Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation.* (A.C. Cassells, B.M. Doyle & R.F. Curry, eds.), Acta Hort. 530.
- Nejad, P.; Johnson, P.A. (2000) Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol. Control* 18, 208-215.
- Nicolescu, C.; Sandre, C.; Jouanin, L.; Chriqui, D. (1996) Genetic engineering of phenolic metabolism in poplar in relation with resistance against pathogens. *Acta Bot. Gallica* 43, 539-546.
- Nilsson, O.; Moritz, T.; Sundberg, B.; Sandberg, G.; Olsson, O. (1996) Expression of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiol.* 112, 493-502.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- O'Connor, M.; Wopat, A.; Hanson, R.S. (1977) Genetic transformation of *Metylobacterium organophilum*. *J. Gen. Microbiol.* 98, 265-272.
- O'Brien, J.G.; Blanchette, R.A.; Sutherland, J.B. (1984) Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of Dutch elm disease. *Plant Dis.* 68, 104-106.
- O'Neill, G.A.; Chanway, C.P.; Axelrood, P.E.; Radley, R.A.; Holl, F.B. (1992) Growth response specificity of spruce inoculated with coexistent rhizosphere bacteria. *Can. J. Bot.* 70, 2347-2353.
- O'Sullivan, D.J.; O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56, 662-676.
- Ochmann, H.; Lawrence, J.G.; Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299 - 304.
- Osusky, M.; Zhou, G.; Osuska, L.; Hancock, R.E.; Kay, W.W.; Misra, S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnol.* 18, 1162 - 1166.
- Page, W.J.; Sadoff, H.L. (1976) Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 125, 1080-1087.
- Palmen, R.; Vosman, B.; Buijsman, P.; Breek, C.K.; Hellingwerf, K.J. (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 295-305.
- Palmen, R.; Vosman, B.; Kok, R.; van der Zee, J.R.; Hellingwerf, K.J. (1992) Characterization of transformation-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Mol. Microbiol.* 6, 1747-54.
- Pansegrau, W.; Lanka, E. (1991) Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nuc. Acids Res.* 19, 3455.
- Pansegrau, W.; Lanka, E. (1996) Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. Independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (TraI) of IncPalma plasmid RP4. *J. Biol. Chem.* 271, 13068-76.

- Pansegrau, W.; Lanka, E.; Barth, P.T.; Figurski, D.H.; Guiney, D.G.; Haas D.; Helinski, D.R.; Schwab, H.; Stanisich, V.A.; Thomas, C.M. (1994) Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. *J. Mol. Biol.* 239, 623-663.
- Pansegrau, W.; Schoumacher, F.; Hohn, B.; Lanka, E. (1993a) Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11538-11542.
- Pansegrau, W.; Schroder, W.; Lanka, E. (1993b) Relaxase (TraI) of IncP alpha plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2925-2929.
- Pansegrau, W.; Ziegelin, G.; Lanka E. (1990) Covalent association of the traI gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. *J. Biol. Chem.* 265, 10637-10644.
- Peña, L.; Martin-Trillo, M.; Juarez, J.; Pina, J.A.; Navarro, L.; Martinez-Zapater, J.M. (2001) Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.* 19, 263-267.
- Petit, A.; Tempé, J.; Holsters, M.; van Montagu, J.; Schell, J. (1978) Substrate induction of conjugative activity of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *Nature* 271, 570-572
- Peuke, A.D.; Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation with transgenic trees. *Z. Naturforsch.* 60 c, 199-207
- PEW: Initiative on Food and Biotechnology (2002) Profiles: Von Humboldt honorees: Saving Hawaii's Papaya. <http://pewagbiotech.org/buzz/display.php3?StoryID=89>. Accessed March 5, 2004.
- Piers, K.L.; Heath, J.D.; Liang, X.; Stephens, K.M.; Nester, E.W. (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1613-1618.
- Pilate, G.; Guiney, E.; Holt, K.; Petit-Conil, M.; Lapierre, C.; Leplé, J.-C.; Pollet, B.; Mila, I.; Webster, E.A.; Marstorp, H.G.; Hopkins, D.W.; Jouanin, L.; Boerjan, W.; Schuch, W.; Cornu, D.; Halpin, C. (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnol.* 20, 607 - 612.
- Pillay, V.K.; Nowak, J. (1997) Inoculation density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43, 354-361.
- Pionnat, S.; Keller, H.; Hélicher, D.; Bettachini, A.; Dessaux, Y.; Nesme, X.; Poncet, C. (1999) Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4197-4206.
- Pirttilä, A.M.; Joensuu, P.; Pospiech, H.; Hohtola, A. (2004) Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiologia Plantarum* 121, 305-312.
- Pirttilä, A.M.; Laukkanen, H.; Pospiech, H.; Myllylä, R.; Hohtola, A. (2000) Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridisation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3073-3077.
- Pirttilä, A.M.; Pospiech, H.; Laukkanen, H.; Myllylä, R.; Hohtola, A. (2003) Two endophytic fungi in different tissues of Scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microb. Ecol.* 45, 53-62.
- Poppenberger, B.; Leonhardt, W.; Redl, H. (2002) Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in micropropagated *Vitis vinifera*. *Vitis* 41, 113-114.
- Porteous, F.; Oeyen, L.; Barac, T.; Trapp, S.; Borremans, B.; van der Lelie, D.; Vangronsveld, J.; Ryan, D.; Germain, K.; Dowling, D.; D'Haene, S.; Campbell, C.D.; Moore, E.R.B.; Karlson, U. (2002) Endophytic bacteria for improving phytoremediation. Poster. [http://www2.dmu.dk/1\\_viden/2\\_Miljoetilstand/3\\_jord/4\\_endegrade/Posters/Porteous\\_ISEB6\\_2002.pdf](http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Miljoetilstand/3_jord/4_endegrade/Posters/Porteous_ISEB6_2002.pdf)
- Poupin, M.J.; Arce-Johnson, P. (2004) Transgenic trees for a new era. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41, 91-101.
- Provedí, R.; Dubnau, D. (1999) ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 31, 271-80.
- Quadt-Hallmann, A.; Benhamou, N.; Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in cotton: mechanisms entering the plant. *Can. J. Microbiol.* 43, 577-582.
- Quispel, A. (1992) A search for signals in endophytic microorganisms, pp. 471-490. In: *Molecular signals in plant - microbe communications*, (D.P.S. Verma, ed.), Boca Raton, Fla., CRC Press.
- Raupach, G.S.; Kloepper, J.W. (1998) Mixtures of plant-growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathol.* 88, 1158-1164.
- Raupach, G.S.; Kloepper, J.W. (2000) Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Dis.* 84, 1073-1075.



- Recchia, G.D.; Hall, R.M. (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol.* 141, 3015-3027.
- Reimann, C.; Haas, D. (1993) Mobilization of chromosomes and nonconjugative plasmids by cointegrative mechanisms, pp.137-138. In: *Bacterial conjugation* (D.B. Clewell, ed.), New York, Plenum press corporation.
- Reiter, B.; Pfeifer, U.; Schwab, H.; Sessitsch, A. (2002) Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sub sp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2261-2268.
- Richaume, A.; Smit, E.; Faurie, G.; van Elsas, J.D. (1992) Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101, 281-291.
- Roggiani, M.; Dubnau, D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srfA*. *J. Bacteriol.* 175, 3182-3187.
- Romanovskaya, V.A.; Stolyar, S.M.; Malashenko, Y.R.; Dodatko, T.N. (2001) The ways of plant colonization by *Methylobacterium* strains and properties of these bacteria. *Microbiol.* 70, 221-227.
- Roos, I.M.M.; Hattingh, M.J. (1983) Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet cherry leaves. *Phytopathol. Z.* 108, 18-25.
- Rossi, L.; Hohn, B.; Tinland, B. (1996) Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 126-130.
- Rottmann, W.H.; Meilan, R.; Sheppard, L.A.; Brunner, A.M.; Skinner, J.S.; Ma, C.; Cheng, S.; Jouanin, L.; Pilate, G.; Strauss, S.H. (2000) Diverse effects of over-expression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homologue of *LEAFY/FLORICAULA* in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J.* 22, 235-245.
- Rudin, L.; Sjostrom, J.E.; Lindberg, M.; Philipson, L. (1974) Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 118, 155-164.
- Rugh, C.L. (2001) Mercury detoxification with transgenic plants and other biotechnological breakthroughs for phytoremediation. *In Vitro Cell. Biol. Plants* 37, 321-325.
- Rugh, C.L.; Senecoff, J.F.; Meagher, R.B.; Meikle, S.A. (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat. Biotechnol.* 16, 925-928.
- Sakiyama, C.C.H.; Paula, E.M.; Pereira, P.C.; Borges, A.C.; Silva, D.O. (2001) Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 117-121.
- Salyers, A.A.; Shoemaker, N.B.; Stevens, A.M.; Li, L.Y. (1995) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59, 579-590.
- Sasser, M. (1990) Identification of bacteria through fatty acid analysis, pp. 199-201. In: *Methods in phytobacteriology* (Z. Klement, K. Rudolph & D.C. Sands, eds.), Budapest, Akademiai Kiado.
- Saunders, J. R. Grinstead, J. (1972) Properties of RP4, an R factor which originated in *Pseudomonas aeruginosa* S8. *J. Bacteriol.* 112, 690-696.
- Sawada, H.; Ieki, H.; Matsuda, I. (1995) PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 828-831.
- Schäfer, A.; Kalinowski, J.; Simon, R.; Seep-Feldhaus, A.-H.; Pühler A. (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 1663-1666.
- Scheiffele, P.; Pansegrau, W.; Lanka, E.J. (1995) Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA *in vitro*. *Biol. Chem.* 270, 1269-1276.
- Schell, J.; van Montagu, M.; Holsters, M.; Hernalsteens, J.P.; De Greve, H.; Leemans, J.; Willmitzer, L.; Schröder, G.; Schröder, J. (1982) Plant cells transformed by modified Ti-Plasmids - a model system for to study plant development. *In vitro*-Journal of the Tissue Culture Association 18, 291.
- Schuler, T.H.; Poppy, G.M.; Kerry, B.N.; Denholm, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 16, 168-175.
- Schumann, W. (1990) *Biologie bakterieller Plasmide*. MbH, Braunschweig Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsges.
- Sederoff, R. (1999) Building better trees with antisense. *Nature Biotechnol.* 17, 750-751.
- Sedjo, R.A. (2004) Transgenic trees: Implementation and Outcomes of the Plant Protection Act. Resources for the future. Discussion paper April 2004, p. 4-10; www.rff.org

- Seyring, M.; Vogt, G. (1996) Einfluss von Phytohormonen auf das Austreten von Endophyten *in vitro* bei *Argyranthemum frutescens*. 33. Wissenschaftliche Arbeitstagung, BDGL-Schriftenreihe Band 14, 129.
- Sheng, J.; Citovsky, V. (1996) *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8, 1699-1710.
- Shin, D.J.; Podila, G.K.; Huang, Y.; Karnosky, D. (1994) Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can. J. For. Res.* 24, 2059-2067.
- Shishido, M.; Loeb, B.M.; Chanway, C.P. (1995) External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Can. J. Microbiol.* 41, 707-713.
- Sies, H. (1995) Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress, pp.165-186. In: Signaling mechanisms - from transcription factors to oxidative stress. (L. Packer & K.Wirtz, eds.), NATO ASI Series, Vol. H 92 Berlin Heidelberg Springer-Verlag.
- Simoens, C.; Alliotte, T.; Mendel, R.; Müller, A.; Schiemann, J.; Van Lijsebettens, M.; Schell, J.; Van Montagu, M.; Inzé, D. (1986) A binary vector for transferring genomic libraries to plants. *Nuc. Acids Res.* 24, 8073-8090.
- Singha, S.; Bissonnette, G.K.; Double, M.L. (1987) Methods for sterilising instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures. *Hort. Science* 22, 659.
- Sisco K.L.; Smith, H.O. (1979) Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 972-697.
- Skinner, J.S.; Meilan, R.; Ma, C.; Strauss, S.H. (2003) The populus PTD promoter imparts floral-predominant expression and enables high levels of floral-organ ablation in *Populus*, *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Mol. Breed.* 12, 119-132.
- Smit, E.; van Elsas J.D.; van Veen J.A.; de Vos W.M. (1991) Plasmid transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous bacteria in soil using bacteriophage fR2f for donor counterselection. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3482-3488.
- Smith, C.A.; Thomas, C.M. (1987) Comparison of the organisation of the genomes of phenotypically diverse plasmids of incompatibility group P: members of the IncP beta sub-group are closely related. *Mol. Gen. Genet.* 206, 419-427.
- Smith, H.O.; Danner, D.B.; Deich, R.A. (1981) Genetic transformation. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 41-68.
- Smith, N.; Kilpatrick, J.B.; Whitlam, G.C. (2001) Superfluous transgene integration in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20, 215-249.
- Smouni, A.; Laplaze, L.; Bogusz, D.; Guermache, F.; Auguy, F.; Duhoux, E.; Franche, C. (2002) The 35S promoter is not constitutively expressed in the transgenic tropical actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Funct. Plant Biol.* 29, 649-656.
- Sobecky, P.A.; Mincer, T.J.; Chang, M.C.; Helinski, D.R. (1997) Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 888-895.
- Sorensen, S.J.; Bailey, M.; Hansen, L.H.; Kroer, N.; Wuertz, S. (2005) Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nature* 3, 700-710.
- Sprinzl, M.; Geider, K. (1988) Transfer of the Ti- plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* to *Escherichia coli* cells. *J. Gen. Microbiol.* 134, 413-424.
- Strauss, S.H.; Meilan, R.; DiFazio, S.; Mohamed, R.; Brunner, A.; Leonardi, S.; Skinner, J.; Krutovskii, K. (1998) Tree Genetic Engineering Research Cooperative (TGERC) annual Report: 1997-1998. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis.
- Strauss, S.H.; Rottmann, W.H.; Brunner, A.M.; Sheppard, L.A. (1995) Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. *Mol. Breed.* 1, 5-26.
- Strohm, M.; Eiblmeier, M.; Langebartels, C.; Jouanin, L.; Polle, A.; Sandermann, H.; Rennenberg, H. (1999) Responses of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. *J. Exp. Botany* 50, 365-374.
- Sturz, A.V.; Christie, B.R.; Matheson, B.G.; Arsenault, W.J.; Buchanan, N.A. (1999) Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne pathogens. *Plant Pathol.* 48, 360-369.
- Sturz, A.V.; Nowak, J. (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing association with crops. *J. Appl. Soil Ecol.* 15, 183-190.

- Szankowski, I.; Briviba, K.; Fleschhut, J.; Schonherr, J.; Jacobsen, H.J.; Kiesecker, H. (2003) Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a *PGIP* gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Rep.* 22, 141-149.
- Taghavi, S.; Barac, T.; Greenberg, B.; Borremans, B.; Vangronsveld, J.; van der Lelie, D. (2005) Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8500-8505.
- Tervet, I.W.; Hollis, J.P. (1948) Bacteria in storage organs of healthy plants. *Phytopathol.* 38, 960-967.
- Thomas, P. (2004) *In vitro* decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77, 173-179.
- Thompson, P.L.; Ramer, L.A.; Schnoor, J.L. (1999) Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine translocation in poplar trees. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 279-284.
- Thorsted, P.B.; Macartney, D.P.; Akhtar, P.; Haines, A.S.; Ali, N.; Davidson, P.; Stafford, T.; Pocklington, M.J.; Pansegrau, W.; Wilkins, B.M.; Lanka, E.; Thomas, C.M. (1998) Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J. Mol. Biol.* 282, 969-990.
- Timmusk, S.; Wagner, E.G. (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 951-9.
- Top, E. (1993) Horizontal gene transfer in the environment and the significance of broad host range plasmids. Thesis on the Rijksuniversiteit, Faculteit van de Landbouwwetenschappen. Gent 199 pp.
- Top, E.; De Smet, I.; Verstraete, W.; Dijkmans, R.; Mergeay, M. (1994) Exogenous isolation of mobilizing plasmids from polluted soils and sludges. *Environ Microbiol.* 60, 831-839.
- Toro, N.; Datta, A.; Carmi, O.A.; Young, C.; Prusti, R.K.; Nester, E.W. (1989) The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol.* 171, 6845-6849.
- Trevors, J.T.; Barkay, T.; Bourquin, A.W. (1987) Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: A review. *Can. J. Microbiol.* 33, 191-198.
- Triebel, J. (2005) Kurzumtriebsplantagen als eine Zukunftsform der Landnutzung. *AFZ – Der Wald* 22, 1199-1200.
- Tuominen, H.; Sitbon, F.; Jacobsson, C.; Sandberg, G.; Olsson, O.; Sundberg, B. (1995) Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol.* 109, 1179-1189.
- Tzfira, T.; Zuker, A.; Altman, A. (1998) Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. *Trends Biotechnol.* 16, 439-446.
- Ushimaru, T.; Kanematsu, S.; Shibasaka, M.; Tsuji, H. (1999) Effect of hypoxia on the antioxidative enzyme in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plant* 107, 181-187.
- Valdes, A.M.; Pinero D. (1992) Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* 46, 641-656.
- Van Aken, B.; Peres, C.M.; Doty, S.L.; Yoon, J.M.; Schnoor, J.L. (2004) *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *Populus nigra* DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1191-1196.
- Van Buren, A.M.; Andre, C.; Ishimaru, C.A. (1993) Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. *Phytopathol.* 83, 1406.
- Van Den Houwe, I.; Swennen, R. (2000) Characterization and control of bacterial contaminants in in vitro cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Hort.* 530, 69-79.
- Van der Graaff, E.; den Dulk-Ras, A.; Hooykaas, P.J. (1996) Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. *Plant Mol. Biol.* 31, 677-681.
- van der Hoeven, C.; Dietz, A.; Landsmann, J. (1991) Latent agrobacteria detected in transgenic plants. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 43, 249-251.
- Van Frankenhuyzen, K.; Beardmore, T. (2004) Current status and environmental impact of transgenic forest trees. *Can. J. Forest Research-Revue* 34, 1163-1180.
- Van Vuurde, J.W.L.; Roozen, N.J.M. (1990) Comparison of immunofluorescence colony-staining in media, selective isolation on pectate medium, ELISA and immunofluorescence cell staining for detection of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* and *E. chrysanthemi* in cattle manure slurry. *Neth. J. Plant Pathol.* 96, 75-89.
- Vega, F.E.; Pava-Ripoll, M.; Posada, F.; Buyer, Y.S. (2005) Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J. Basic Microbiol.* 45, 371-380.

- Vogel, J.P.; Andrews, H.L.; Wong, S.K.; Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*. 279, 873-876.
- von Wühlisch, G. (2005) Schnellwüchsig und anspruchslos. *Brandenburger Bauernzeitung* 46 (49-50).
- Walter, C.; Charity, J.; Grace, L.; Höfig, K.; Möller, R.; Wagner, A. (2002) Gene technologies in *Pinus radiata* and *Picea abies*: tools for conifer biotechnology in 21st century. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70, 3-12.
- Wang, G.; Castiglione, S.; Chen, Y.; Li, L.; Han, Y.; Tian, Y.; Gabriel, D.W.; Han, Y.; Mang, K.; Sala, F. (1996) Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxine gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transg. Res.* 5, 289-301.
- Wang, H. (2004) The state of genetically modified forest trees in China. In: Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Forest Genetic Resources Working Papers Forest Resources Division FAO, Rome, Italy.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. (2003) Plant responses to drough, salinity and extreme temperatures: towards genetic engeneering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Ward, J.E. Jr.; Dale, E.M.; Binns, A.N. (1991) Activity of the *Agrobacterium* T-DNA transfer machinery is affected by *virB* gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 9350-9354.
- Waters, V.L. (2001) Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nature Genetics* 29, 375-376.
- Waters, V.L.; Guiney, D.G. (1993) Process at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol. Microbiol.* 9, 1123-1130.
- Watson, B.; Currier, T.C.; Gordon, M. P.; Chilton, M. D.; Nester, E. W. (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- Weller, S.A.; Simpkins, S.A.; Stead, D.E.; Kurdziel, A.; Hird, H.; Weekes, R.J. (2002) Identification of *Agrobacterium* spp. present within *Brassica napus* seed by Taqman PCR - implications for GM screening procedures. *Arch. Microbiol.* 178, 338-343.
- White, F.F.; Nester, E.W. (1980) Relationships of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J. Bacteriol.* 144, 710-720.
- Whitesides, M.D.; Oliver, J.D. (1997) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1002-1005.
- Whitesides, S.K.; Spotts, R.A. (1991) Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathol.* 81, 453-457.
- Will, B.; Eiblmeier, M.; Langebartels, C.; Renneberg, H. (1997) Consequences of chronic ozone exposure in transgenic poplars over-expressing enzymes of the glutathione metabolism, pp. 257-259. In: Sulphur metabolism in higher plants - molecular, ecophysiological and nutritional aspects (W.J. Cram, L.J. DeKok, I. Stulen, C. Brunold & H. Rennenberg, eds.), Leiden, Backhuys Publishers.
- Willetts, N.; Crowther, C. (1981) Mobilisation of the non-conjugative InQ-Plasmid RSF1010. *Genet. Res.* 37, 311-316.
- Wilson, D. (1995) Endophyte: the evolution of the term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274-276.
- Winans, S.C. (1992) Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.* 56, 12-31.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- [www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de): Bodenentgiftung mittels gentechnisch veränderter Pappeln.
- [www.cambia.org.au/daisy/cambia/585.html#dsy585\\_References](http://www.cambia.org.au/daisy/cambia/585.html#dsy585_References)
- [www.cambia.org](http://www.cambia.org): What is CAMBIA?
- [www.esf.edu/PUBPROG/elm/default.htm](http://www.esf.edu/PUBPROG/elm/default.htm); Engeneering Disease-resistant American elm trees
- [www.ostp.gov/html/ceq\\_ostp\\_study6.pdf](http://www.ostp.gov/html/ceq_ostp_study6.pdf)
- Yakobson, E.; Guiney G. (1983) Homology in the transfer origins of broad host range IncP plasmids: definition of two subgroups of P plasmids. *Mol. Gen. Genet.* 192, 436-438.
- Yang, M.S.; Lang, H.Y.; Gao, B.J.; Wang, Y.F.; Zheng, J.B. (2003) Insecticidal activity and transgene expression stability of transgenic hybrid poplar clone 741 carrying two insect-resistant genes. *Silvae Genetica* 52, 197-201.
- Yanofsky, M.F.; Porter S.G.; Young, C.; Albright, L.M.; Gordon, M.P.; Nester, E.W. (1986) The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 7, 471-477.
- Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M.; Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2, 2143-2150.

- Zatyka, M.; Bingle, L.; Jones, A.D.; Thomas, C.M. (2001) Cooperativity between KorB and TrbA repressors of broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 183, 1022-1031.
- Zhu, J.; Oger, P.M.; Schrammeijer, B.; Hooykaas, P.J.J.; Farrand, S.K.; Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182, 3885-3895.
- Zupan, J.; Muth, T.R.; Draper, O.; Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11-28.
- Zweigerdt, R. (1993) Nachweis persistierender Agrobakterien in transgenem Kartoffelmaterial. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.