

Bedeutung endophytischer Bakterien in Forstgehölzen

„Probiotische“ Bakterien für Bäume?

Von Kristina Ulrich und Dietrich Ewald, Waldsieversdorf

Ein Hauptanliegen der forstlichen Forschung ist die Verbesserung der Leistungsfähigkeit, Qualität und Widerstandsfähigkeit von Gehölzen, besonders auch unter dem Aspekt eines sich ändernden Klimas. Neben Züchtung und deren modernster Form der Gentechnik könnte in Zukunft auch eine gezielte Anwendung von endophytischen Bakterien zur Verbesserung der Eigenschaften von Forstgehölzen beitragen. Möglich wären zum Beispiel der Einsatz von Präparaten mit phytohormonproduzierenden endophytischen Bakterien zur Steigerung der Biomasseproduktion in Kurzumtriebsplantagen, die Erhöhung der Vitalität und Stabilität von Bäumen oder die Nutzung von Bakterien mit besonderen metabolischen Fähigkeiten z.B. zur Phytosanierung schadstoffbelasteter Flächen.

Forstgehölze sind eng assoziiert mit den unterschiedlichsten Mikroorganismen. Während das Wissen um das Vorhandensein einer Beziehung zwischen Bäumen und Pilzen in Form der so genannten Mykorrhiza oder Pilzwurzel besonders bei Forstleuten (und Pilzsammlern) weit verbreitet ist, wird den Bakterien weniger Aufmerksamkeit zuteil.

Bakterienverursachte Erkrankungen wie Schleimfluss bei Kastanie und Pappelkrebs lassen sich als negative Wirkungen von Bakterien noch erkennen, aber das Vorkommen und gar positive Wirkungen endophytischer Bakterien finden bisher wenig Beachtung. Dabei handelt es sich hier um ein Gebiet, dem mehr und mehr Bedeutung zukommt. Mit der Verbesserung des Nachweises endophytischer Bakterien, ihrer genetisch exakten Charakterisierung und der Möglichkeit, erste Erkenntnisse an endophytenverarmten Gewebekulturpflanzen im Labor gewinnen zu können, eröffnet sich ein weites Feld der Erkenntnis ihrer Wirkung im na-

türlichen System bis hin zur praktischen Anwendung, von dem wir momentan gerade erst einmal den Rand erblicken.

Was sind endophytische Bakterien?

Endophytische Bakterien wurden in nahezu allen Pflanzenarten, darunter auch in einer Vielzahl von Bäumen nachgewiesen. Sie besiedeln das innere Gewebe von Pflanzen, ohne ihrem Wirt sichtbare Schä-

den zuzufügen. Zusammensetzung und Stärke der Besiedlung sind sehr variabel und von Art und Alter der Pflanze, dem Pflanzenorgan, dem Gewebetyp, saisonalen Schwankungen und den externen Bedingungen abhängig. Durchschnittliche Endophytenkonzentrationen liegen in holzigem Gewebe bei 10^3 bis 10^4 koloniebildenden Einheiten pro Gramm Pflanzmasse [1].

Endophytische Bakterien können entweder schon über die Samen übertragen werden oder später über die Keimwurzeln, Wurzeln, Stomata oder Läsionen in den Blättern in die Pflanze gelangen. Von dort aus können sie sich über das Gefäßsystem systemisch über die gesamte Pflanze ausbreiten und die Zellen bestimmter Gewebe, Interzellularen oder das Gefäßsystem besiedeln.

Welche Wirkung haben endophytische Bakterien auf die Pflanze?

In den letzten Jahren werden endophytische Bakterien aufgrund ihres Lebensraumes innerhalb der Pflanze und der sich

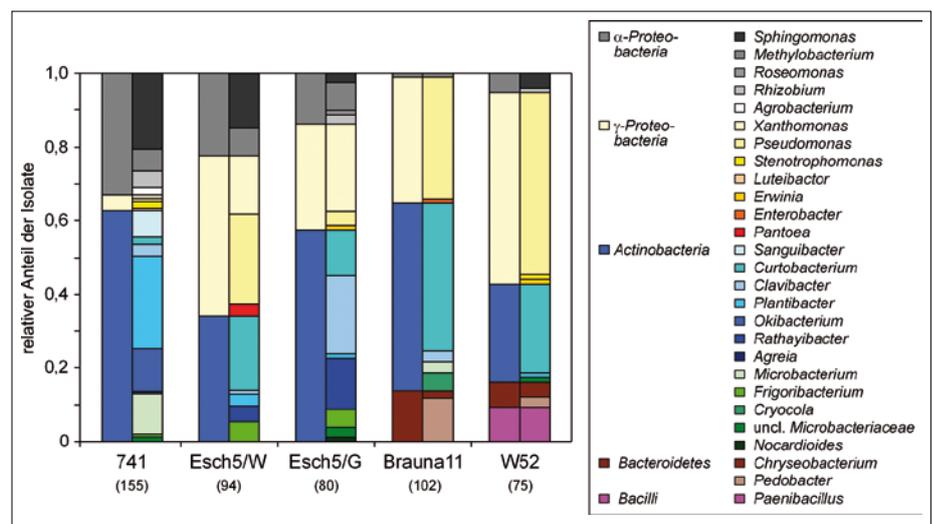


Abb. 1: Zusammensetzung der kultivierbaren endophytischen Bakteriengemeinschaften im Vergleich unterschiedlicher Pappelklone. Der linke Teil der Säulen zeigt jeweils die relativen Anteile der Bakterienklassen, der rechte Teil stellt die Diversität auf Gattungsebene dar. W-Standort Waldsieversdorf, G-Standort Großhansdorf. 741 (*P. alba* x [*P. davidiana* + *P. simonii*] x *P. tomentosa*), Esch5 (*P. tremula* x *P. tremuloides*/ Brauna11x Tur141), Brauna11 (*P. tremula*), W52 (*P. tremula*)

Dr. K. Ulrich ist Mitarbeiterin des Instituts für Forstgenetik des Johann Heinrich von Thünen-Instituts in Waldsieversdorf.



Kristina Ulrich
kristina.ulrich@vti.bund.de

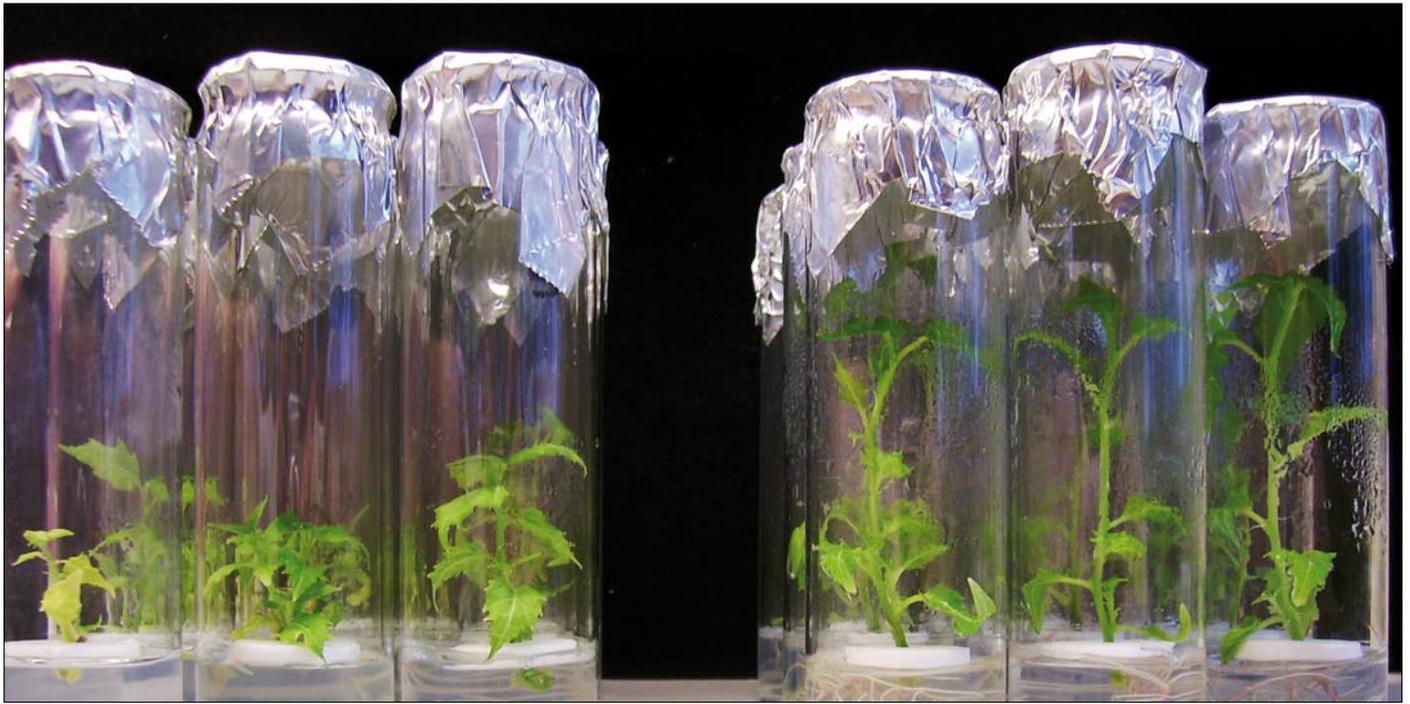


Abb. 2: Einfluss des endophytischen Bakteriums *Stenotrophomonas* sp. auf das Wachstum des Pappelklons 741 in vitro, links: unbeimpfte Variante, rechts: Beimpfung mit einer *Stenotrophomonas*-Kultur

daraus ergebenden engen Verbindung zu ihrem Wirt immer mehr damit in Verbindung gebracht, ihrer Wirtspflanze bestimmte Eigenschaften zu verleihen, an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt und wahrscheinlich sogar lebenswichtig für die Pflanze zu sein.

Zu den positiven Wirkungen gehören vor allem die Stimulation des Wachstums und der Entwicklung der Wirtspflanze, die biologische Kontrolle unterschiedlicher phytopathogener Mikroorganismen und die Stressregulation. Direkte Wachstumsförderung beruht meist auf der Bildung von Phytohormonen wie Auxinen und Cytokininen bzw. deren Vorstufen und wurde für Stämme der Gattungen *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium* und *Bacillus* nachgewiesen [2, 3, 4, 5]. Aber auch andere Mechanismen wie die Produktion von Siderophoren, die der Pflanze die Aufnahme von Eisen oder Phosphor erleichtern [6], oder die Synthese bestimmter wachstumsstimulierender Enzyme oder Substanzen [7, 8] können eine positive Entwicklung der Pflanze bewirken.

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 [9].

Antagonistische Wirkungen endophytischer Bakterien auf phytopathogene

Pilze und Bakterien wurden vielfach beschrieben und beruhen neben der einfachen Konkurrenz hauptsächlich auf der Produktion von antimikrobiellen Substanzen wie Antibiotika oder HCN oder der Beeinflussung der pflanzlichen Abwehrkraft z.B. durch Induktion von systemischen Resistenzen [10, 11, 12]. Die Beteiligung von endophytischen Bakterien an der Bewältigung von abiotischem Stress (Trockenstress) wurde von FORCHETTI et al. [13] beschrieben.

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

- Bei endophytischen Pseudomonaden aus Zitruspflanzen konnten stimulierende Effekte auf das Wachstum von Keimlingen nachgewiesen werden [14].
- Eine reproduzierbare Erhöhung der Biomasse von bis zu 36 % wurde durch Inokulation von Fichtensetzlingen mit endophytischen Isolat der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* und *Phyllobacterium* erreicht [15].
- DAHM et al. [16] isolierten aus Kiefernwurzeln endophytische Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Pasteurella*, die bei Eisenmangel Siderophore (metallbindende organische Verbindungen) produzieren und damit der Pflanze durch die Bereitstellung von Eisen-Ionen einen ökologischen Vorteil verschaffen.

Auch die biologische Kontrolle von pathogenen Erregern durch endophytische Bakterien scheint bei Gehölzen von Bedeutung zu sein.

- BROOKS et al. [17] 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*-Stämme als wirkungsvolles Mittel zur biologischen Kontrolle bei der Aufzucht von Keimlingen isoliert [18].
- ARAUJO et al. [19] fanden Hinweise auf die Induzierung einer systemischen Resistenz gegenüber dem Zitrus-Chlorosis-Erreger durch Endophyten der Art *Curtobacterium flaccumfaciens*.

Endophytische Bakterien der Pappel

In unterschiedlichen Freilandpappelklonen wurden Endophytengemeinschaften über die Analyse der kultivierbaren Bakterien untersucht. Daneben wurden Klonbibliotheken der ribosomalen RNA-Gene der endophytischen Bakterienflora der Pappelklone angelegt, um auch nicht kultivierbare Bakterien zu erfassen. Insgesamt ergab sich eine hohe Diversität mit 53 Taxa auf Gattungsebene, wobei die Aktinobakterien und Proteobakterien den Hauptanteil ausmachten. Außerdem zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Zusammensetzung des Endophytenbesatzes vom Pappelklon [20]. Die Ergebnisse der Analyse der kultivierbaren endophytischen Bakteriengemeinschaften verschiedener Klone sind in Abb. 1 dargestellt.

Vergleichbare Untersuchungen von MOORE et al. [21] an Pappelklonen auf BTEX

(Benzen, Toluol, Ethylbenzen, Xylen)-verseuchten Böden zeigten eine deutlich andere Endophytenzusammensetzung. Der Anteil der γ -Proteobakterien, speziell der Pseudomonaden, die die Fähigkeit zum Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe besitzen, war hier fast doppelt so hoch, verglichen mit unseren Untersuchungen, die auf nicht belasteten Böden durchgeführt wurden. Hier zeigen sich Parallelen zu Arbeiten von SICILIANO et al. [22], der Hinweise darauf fand, dass Pflanzen je nach den gegebenen äußeren Bedingungen ihre Endophytenbesiedlung steuern können. So können z.B. endophytische Bakterien mit bestimmten metabolischen Fähigkeiten beim Wachstum auf Böden, die einen hohen Gehalt an organischen Schadstoffen besitzen, angereichert werden.

Besonders bei langlebigen Pflanzen wie Bäumen geht man davon aus, dass über einen längeren Zeitraum ein Endophytenspektrum aufgebaut wird, das entsprechend den Umweltbedingungen Überlebens- oder Wachstumsvorteile bringen kann. In forstlichen Ökosystemen können endophytische Bakterien zu einer effektiven Erhöhung der phänotypischen Plastizität der langlebenden Wirtspflanzen unter sich verändernden oder ungünstigen Umweltbedingungen wie Trockenperioden, Nährstoffmangel oder Pathogenbefall beitragen [23].

Mögliche Anwendung endophytischer Bakterien

Aus den vielfältigen Eigenschaften der endophytischen Bakterien ergibt sich ein breites Anwendungsspektrum:

1. Nutzung von endophytischen Bakterien zur Steigerung der Biomasseproduktion: Voraussetzung für diese Art der Nutzung ist die Isolation bestimmter endophytischer Bakterien mit wachstumsfördernden Eigenschaften, die dann zur Inokulation von Pappeln oder Weiden in Kurzumtriebsplantagen genutzt werden können. In den USA wurden nach erfolgversprechenden Startversuchen [24] erste Projekte zur Erhöhung der Biomasseproduktion bei Pappeln durch Inokulation mit endophytischen Bakterien vom United Department of Energy aufgelegt. Auch in eigenen Untersuchungen wurde unter Verwendung von Pappelpflanzen, die frei von kultivierbaren endophytischen Bakterien waren (Kultivierung von Meristemen), die wachstumsfördernde Wirkung von endophytischen Isolaten der Gattungen *Paenibacillus* [25] und *Stenotrophomonas* auf

das Wurzel- bzw. Sprosswachstum nachgewiesen (Abb. 2).

2. Phytosanierung durch endophytische Bakterien: Bestimmte endophytische Bakterien besitzen die Fähigkeit zum Abbau von organischen Schadstoffen oder der Bindung/Reduktion von Schwermetallen. Nutzt man diese Bakterien zur Beimpfung von Pflanzen bei der Phytosanierung, kann man die Effektivität des Abbaus der entsprechenden Substanzen erhöhen [26]. Gegenwärtig wird daran gearbeitet, die Phytosanierung von Grundwasser durch Pappeln und Weiden auf diese Weise zu optimieren [26, 27]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass Plasmide (extrachromosomale, ringförmige DNA), die bestimmte metabolische Fähigkeiten tragen, im Gewebe des Baumes von einem endophytischen Bakterium auf andere übertragen werden können, ihre Fähigkeit zum Abbau bestimmter Substanzen weitergeben und damit die Effektivität der Phytosanierung erhöht werden kann [27].

3. Erhöhung der Stresstoleranz und Vitalität von Gehölzen: Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Nutzung von endophytischen Bakterien zur Erhöhung der Toleranz gegenüber abiotischem Stress, was besonders im Zuge der Klimaerwärmung und dem damit verbundenen Trockenstress an Bedeutung gewinnt. Aber auch die biologische Kontrolle von pathogenen Mikroorganismen (biotischer Stress) durch endophytische Bakterien könnte unter den sich verändernden Umweltbedingungen zum Tragen kommen.

4. Nutzung von endophytischen Bakterien für die *in vitro*-Kultivierung: Auch bei der *in vitro*-Vermehrung von Gehölzen könnten endophytische Bakterien zur Stabilisierung der Pflanzen, zur Stimulation der Wurzelbildung und des Sprosswachstums sowie zur Pathogenabwehr genutzt werden. In unseren bisherigen Versuchen zeigten z.B. endophytenfreie (Meristem-)Pappelpflanzen häufig ein schlechtes bzw. verzögertes Wurzelwachstum. „Störende“ endophytische Bakterien, also Problembakterien, könnten so durch Meristemkultur entfernt und durch positiv wirkende Endophyten ersetzt werden.

Folgerung

Die Untersuchung der Endophytenzusammensetzung in forstlichen Gehölzen und die gezielte Analyse ihrer Wirkung an Forstpflanzen, die aus Meristemen regeneriert wurden und damit frei von kultivierbaren endophytischen Bakterien sind,

erlauben Rückschlüsse auf die Wirkung einzelner endophytischer Bakterien. Es wird damit möglich, die Bedeutung endophytischer Bakterien in Forstpflanzen besser zu verstehen und für die Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Widerstandsfähigkeit von Gehölzen zu nutzen.

Literaturhinweise:

- [1] 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. [2] 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. [3] SUCKSTORFF, I.; BERG, G. (2003): Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *J. Appl. Microbiol.* 95, 656-663. [4] THOMAS, P. (2004): Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *J. Appl. Microbiol.* 97, 114-123. [5] ABANDA-NKPWATT, D.; MÜSCH, M.; TSCHIRSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. (2006): Molecular interaction between *Methylobacterium* exorquens and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57, 4025-4032. [6] CASTIGNETTI, D.; SMARELLI, J. Jr. (1986): Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Lett.* 209, 147-151. [7] 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. [8] PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; YANG, G. P.; MARTINEZ-ROMERO, E.; SANBORN, J. R.; VOLPIN, H. (1999): Identification of lumicrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *PNAS, USA* 96, 12275-12280. [9] HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895-914. [10] 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. [11] BLUMER, C.; HAAS, D. (2000): Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173, 170-177. [12] MADHAIYAN, M.; POONGUZHALLI, 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*) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 315-324. [13] FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D. (2007): Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus*): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1145-1152. [14] 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. [15] 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. [16] DAHM, H.; HRYNKIEWICZ, K.; STRZELCZYK, E.; WROTHIAK, W. (2003): Studies on the production of siderophores by forest trees endophytic bacteria and fungi. *Folia Forest. Polonica* 45, 5-13. [17] 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. [18] 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. [19] 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. [20] ULRICH, K.; ULRICH, A.; EWALD, D. (2008): Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 169-180. [21] MOORE, P. F.; BARAC, T.; BORREMANNS, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; Van der Lelie, D.; Campbell, C.D.; Moore, E.R.B. (2006): Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 539-556. [22] SICILIANO, S. D.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D.; ROY, R.; WHYTE, L. G.; BANKS, M. K.; SCHWAB, P.; LEE, K.; GREER, C. W. (2001): Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2469-2475. [23] CHANWAY, C.P. (1998): Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia* 50: 149-170. [24] TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D. (2007): Beneficial effects of endophytic bacteria on biomass production by poplar. <http://www.orau.gov/GTL2007/abstracts/taghavi.pdf> [25] ULRICH, K.; STAUBER, T.; EWALD, D. (2008): *Paenibacillus* - a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 93, 347-351. [26] BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANNS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J.V.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. (2004): Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnol.* 22, 583-588. [27] TAGHAVI, S.; BARAC, T.; GREENBERG, B.; BORREMANNS, 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.