

Endophytische Bakterien könnten zur Steigerung des Ertrages und der Stressresistenz von Forstgehölzen beitragen

Von Kristina Ulrich<sup>1</sup>, Christian Scherling<sup>2</sup>, Wolfram Weckwerth<sup>3</sup> und Dietrich Ewald<sup>4</sup>

In der forstlichen Forschung geht es vor allem um die Verbesserung der Leistungsfähigkeit, Qualität und Widerstandsfähigkeit von Gehölzen, nicht zuletzt auch unter dem Aspekt der Erzeugung schnell wachsender Baumarten für die Biomasseproduktion auf Kurzumtriebsplantagen. Neben Züchtungsprogrammen könnte in Zukunft auch eine gezielte Anwendung wachstumsstimulierender endophytischer Bakterien zur Verbesserung der Eigenschaften von Forstgehölzen beitragen. Denkbar wäre zum Beispiel der Einsatz Phytohormon produzierender oder Stickstoff fixierender Bakterien zur Erhöhung der Vitalität und Steigerung des Wachstums von Gehölzen, aber auch die Nutzung von Bakterien mit besonderen metabolischen Fähigkeiten z. B. zur Phytosanierung Schadstoff belasteter Flächen.

Noch vor einigen Jahren wurde das Vorhandensein von Bakterien in Gehölzen fast ausschließlich im Zusammenhang mit Pflanzenkrankheiten wie zum Beispiel Pappelkrebs oder Schleimfluss bei Kastanie gesehen. Positive Wirkungen endophytischer Bakterien fanden bisher wenig Beachtung. In den letzten Jahren werden in der Pflanze lebende Bakterien 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.

## 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 Schäden 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. Endophytische Bakterien können entweder schon über die Samen übertragen werden oder später über die Keimwurzeln, Wurzeln, Stomata oder Verletzungen 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.

In bisherigen Untersuchungen der Endophytengemeinschaften von verschiedenen Freiland-Pappelklonen zeigte sich eine hohe Diversität der endophytischen Bakterien, die über 50 Gattungen verschiedener Klassen beinhaltete. Auch konnte eine deutliche Abhängigkeit der Zusammensetzung des Endophytenbesatzes vom Genotyp der Wirtspflanze nachgewiesen werden. In Abbildung 1 ist die unterschiedliche Zusammensetzung der bakteriellen Endophytengemeinschaften verschiedener Pappelklone dargestellt, die sich sowohl auf Ebene der Bakterienklassen als auch auf Gattungsebene zeigt.

## Unterschiedlichste Wirkmechanismen

Positive Effekte endophytischer Bakterien auf die Wirtspflanze gehen auf

1) Kristina Ulrich ist wissenschaftliche Mitarbeiterin im Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Waldsiedersdorf  
2) Christian Scherling ist Post-Doc an der TU Braunschweig, Bioinformatik und Biochemie  
3) Dietrich Ewald ist Standortvertreter des Institutsleiters am Standort Waldsiedersdorf im Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Waldsiedersdorf  
4) Wolfram Weckwerth ist Professor für Molekulare Pflanzenphysiologie an der Universität Wien, Molekulare Systembiologie

unterschiedlichste Mechanismen zurück wie zum Beispiel die antagonistische Wirkung durch Produktion von Antibiotika, die Induktion von Resistenzen, die Bildung von Siderophoren, die der Pflanze die Aufnahme von Eisen oder Phosphor erleichtern, oder die Synthese bestimmter wachstumsstimulierender Enzyme und Substanzen.

Direkte Wachstumsförderung, also eine Steigerung der Biomasseproduktion, beruht meist auf der Bildung von Phytohormonen wie Auxin und Cytokinin bzw. deren Vorstufen. Eine signifikante Steigerung des Pflanzenwachstums im Zusammenhang mit der Bildung von Hormonen wurde für verschiedene Stämme der Gattungen *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Burkholderia* und *Bacillus* nachgewiesen. In letzter Zeit wurden außerdem Hinweise auf die wachstumsfördernde Wirkung diazotropher endophytischer Bakterien in Pappeln gefunden, die in der Lage sind, elementaren molekularen Stickstoff aus der Luft zu reduzieren und damit in eine biologisch verfügbare Form umzuwandeln.

## Analyse von Endophyten-Gemeinschaften

Zur Isolation der Endophyten homogenisiert man oberflächensterilisiertes Pflanzenmaterial wie Äste oder Blätter, verdünnt die Proben und spaltet sie auf Bakterienmedium aus. Nach ungefähr einer Woche kann man die Bakterienkolonien selektieren und durch molekular-genetische Methoden (Analyse der 16S rDNA) identifizieren. Jedoch ist nur ein relativ geringer Prozentsatz der endophytischen Bakterien kultivierbar. Viele Endophyten sind aufgrund ihrer Spezialisierung in der Wirtspflanze nicht ohne weiteres auf normalen Medien zu kultivieren.

## Bakterien verändern den Stoffwechsel der Pflanze

Die Wirkung bestimmter Bakterien auf eine Wirtspflanze ist schwer zu er-

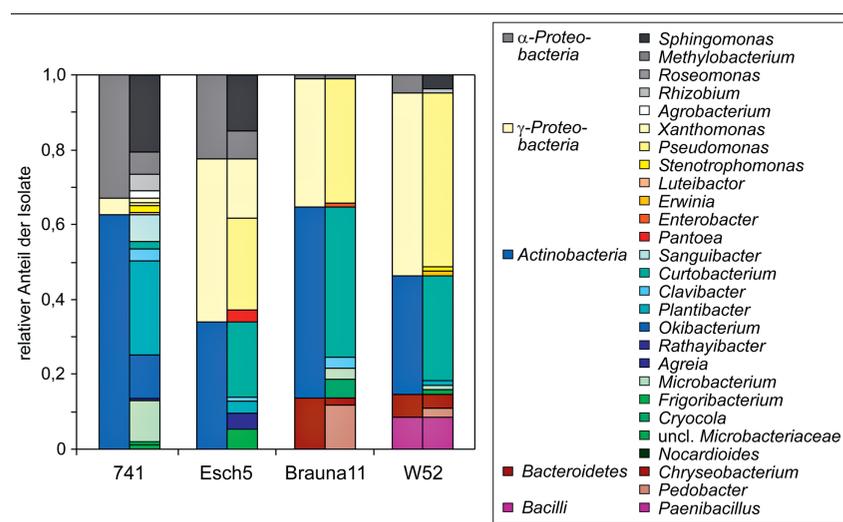


Abbildung 1 Zusammensetzung der kultivierbaren endophytischen Bakteriengemeinschaften verschiedener Freiland-Pappelklone. Der linke Teil der Säulen zeigt jeweils die relativen Anteile der Bakterienklassen, der rechte Teil stellt die Diversität auf Gattungsebene dar.



Abbildung 2 Im *in vitro*-Test steigert ein endophytischer *Stenotrophomonas*-Stamm das Spross- und Wurzelwachstum von Pappel-Pflanzen signifikant (links: unbeimpfte, rechts: beimpfte Variante)

fassen, weil wahrscheinlich alle Pflanzen – auch die aus der *in vitro*-Kultivierung – schon natürlicherweise von verschiedenen endophytischen Bakterien besiedelt werden.

Aus isolierten Meristemen konnten *in vitro*-Pflanzen erzeugt werden, die über lange Zeit frei von kultivierbaren Bakterien waren. Diese Pflanzen sind die Voraussetzung zur gezielten Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher endophytischer Bakterien. So konnte gezeigt werden, dass die Beimpfung mit einem aus einer Freiland-Pappel isolierten endophytischen *Stenotrophomonas*-Stamm zur deutlichen Steigerung des Wurzel- und Sprosswachstums von *in vitro*-Pappeln führt (vgl. Abbildung 2). Ein endophytischer *Paenibacillus*-Stamm stimulierte ebenfalls signifikant die Wurzelbildung.

Erste Untersuchungen zum Einfluss endophytischer Bakterien auf den Stoffwechsel der Wirtspflanze wurden mittels „targeted Metabolic Profiling“ durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgt die quantitative Bestimmung einer Vielzahl ausgewählter Metabolite (Stoffwechselprodukte) der Pflanze, um zielgerichtet Substanzen benennen zu können, die durch den Einfluss der endophytischen Bakterien verändert werden. Um den Einfluss anderer Endophyten weitgehend auszuschließen, wurden auch hier *in vitro*-Pappel-Pflanzen verwendet, die frei von kultivierbaren endophytischen Bakterien waren. Nach Inokulation (Beimpfung) mit einem *Paenibacillus*-Stamm, der in Vorversuchen die Wurzelbildung stimuliert hatte (siehe oben) wurden diese Pflanzen und die entsprechende unbeimpfte Kontrolle untersucht.

Insgesamt wurden 70 Metabolite des Primärmetabolismus identifiziert und quantifiziert. Deutliche Unterschiede in den Metabolitprofilen beider Varianten zeigen, dass die Anwesenheit des *Pae-*

*nibacillus*-Stammes die Zusammensetzung der pflanzlichen Stoffwechselprodukte im Vergleich zur unbehandelten Variante unerwartet stark veränderte. Als Antwort auf die Anwesenheit der Bakterien produzierten die Wirtspflanzen in ihren Zellen etwa achtmal mehr Asparagin und sechsmal mehr Harnstoff. Der Gehalt an organischen Säuren des Tricarbonsäure-Cyclus nahm dagegen deutlich ab.



Abbildung 3 Einfluss von endophytischen Bakterien (*Paenibacillus*) auf die Wurzelbildung von Pappel-Stecklingen (rechts) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (links)

Alles deutet darauf hin, dass der *Paenibacillus*-Stamm – ähnlich wie andere Vertreter dieser Art – die Fähigkeit zur Stickstoffbindung besitzt (Der Stamm wächst auch auf einem stickstofffreien Bakterienmedium!) und dadurch das Stickstoff-Assimilationsmuster der Pflanze verändert. Die Bakterien induzieren so ein spezifisches Stoffwechselmuster, das dem der Leguminosen (Hülsenfrüchtler) sehr ähnlich ist. Leguminosen gehen eine Symbiose mit den so genannten Knöllchenbakterien (Rhizobien) ein, die Stickstoff aus der Luft zu Ammonium reduzieren, welches sie der Pflanze zur Verfügung stellen und im Austausch dafür Kohlenhydrate beziehen.

Während die biologische Stickstofffixierung durch die Rhizobien umfassend erforscht ist und landwirtschaftlich vielseitig genutzt wird, stehen die Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen diazotrophen Bakterien – also Bakterien, die elementaren, molekularen Stickstoff fixieren können – und Nicht-Leguminosen noch eher am Anfang. Die Aufklärung der Funktion und vor allem die Anwendung von stickstofffixierenden Bakterien, die symbiotische Beziehungen zu wirtschaftlich bedeutsamen Pflanzen eingehen, könnten von großem Nutzen sein.

## Anwendung und Aussichten

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

**Nutzung von wachstumsstimulierenden endophytischen Bakterien zur Steigerung der Biomasseproduktion von Pappel- und Weidenklonen für den effektiven Einsatz in Kurzumtriebs-plantagen**

In den USA wurden nach erfolgversprechenden Startversuchen erste Projekte zur Steigerung der Biomasseproduktion bei Pappeln durch Inokulation mit endophytischen Bakterien vom United Department of Energy gefördert. Erste Auswertungen ergaben Biomassesteigerungen von bis zu 50 % und zeigen die Bedeutung dieser Strategie für die Produktion nachwachsender Rohstoffe.

## Phytosanierung durch endophytische Bakterien

Bestimmte Endophyten 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. Gegenwärtig wird daran gearbeitet, die Phytosanierung von Grundwasser durch Pappeln und Weiden auf diese Weise zu optimieren. Schnellwachsende Bäume mit stickstofffixierenden endophytischen Bakterien könnten als Pionierarten zur forstlichen Rekultivierung von extrem nährstoffarmen oder belasteten Standorten, wie zum Beispiel Bergbaufolgelandschaften, verwendet werden.

## 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 Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen (biotischer Stress) durch endophytische Bakterien (biologische Kontrolle) könnte unter den sich verändernden Umweltbedingungen zum Tragen kommen.

Zur genauen Aufklärung der Wirkungen endophytischer Bakterien auf die Pflanzen und zur gezielten Nutzung der positiven Effekte sind noch viele Untersuchungen notwendig.

Im Rahmen verschiedener Projekte muss in Zukunft getestet werden, in wie weit diese noch eher theoretischen Vorstellungen bzw. bisher nur im Labor oder im Gewächshaus überprüften Möglichkeiten der Anwendung endophytischer Bakterien in die Praxis überführbar und effektiv einsetzbar sind.