

**Biologische Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter *Rhizobium meliloti* Stämme: Überleben, Verbreitung und Wechselwirkung des freigesetzten Organismus mit der endogenen Bodenmikroflora zweier Freisetzungsorte**

Verbundvorhaben der Forschungseinrichtungen:

Universität Bielefeld, ZALF Müncheberg, Universität Erlangen,

FAL Braunschweig, TÜV Energie und Umwelt GmbH Freiburg

Teilprojekt :

**Entwicklung und Erprobung von Monitoring Methoden zur Spezies-spezifischen Detektion und Computer-gestützten Typisierung von Rhizobienstämmen**

Forschungsstelle:

TÜV Südwest Dienstleistungs-GmbH

Biologische Sicherheit

Robert-Bunsen-Straße 1

**79108 Freiburg**

Telefon: 0761- 506061

FAX: 0761- 506062

Projektleiter/Sachbearbeiter: **Dr. R. Simon / Dr. H.-V. Tichy**

## 1. Zusammenfassung

---

Im Rahmen des Verbundvorhabens wurden von der Arbeitsgruppe Freiburg PCR-Fingerprint-Methoden optimiert. Diese Optimierung der PCR-Primer und -Reaktionsbedingungen war die Basis für die Etablierung einer effizienten, Computer-gestützten Auswertung, die wiederum bei den im Projekt anfallenden hohen Probenzahlen unabdingbar war.

Die im Projekt weiterentwickelten und eingesetzten Fingerprint-Methoden liefern entweder Informationen über die Spezieszugehörigkeit (ARDRA = *amplified ribosomal DNA-restriction analysis*) oder über die Heterogenität verschiedener Stämme innerhalb einer Spezies (RAPD: *random amplified polymorphic DNA*).

Für beide Methoden wurden optimierte Primerpaare bzw. *arbitrary* Primer und Protokolle entwickelt sowie in Testserien standardisiert. Für das Fingerprinting mit dem Automated Laser Fluorescent (A.L.F.) Sequenzierautomaten wurden speziell angepaßte Protokolle erarbeitet. Die Methoden/Protokolle wurden den Partnern des Verbundprojektes unmittelbar zur Verfügung gestellt.

Neben der Entwicklung/Optimierung der Methodik wurde diese auch direkt zur Erarbeitung von Ergebnissen innerhalb des Projektes eingesetzt, vor allem zur Charakterisierung der endogenen *Rhizobium meliloti* - Population des Freisetzungsorts.

Mit Hilfe der ARDRA-Methode ließ sich eine Inhomogenität der Isolate aus Luzerne auf Speziesebene feststellen. Die Sequenzbestimmung der 16S rDNA aus einem der Isolate mit *R. meliloti*-untypischem ARDRA-Muster ergab eine Identität auf 16S rDNA Ebene mit dem Stamm *R. spec.* OR191, einem Isolat aus Oregon, USA, das sowohl Bohne als auch Luzerne noduliert.

## 2. Einleitung

---

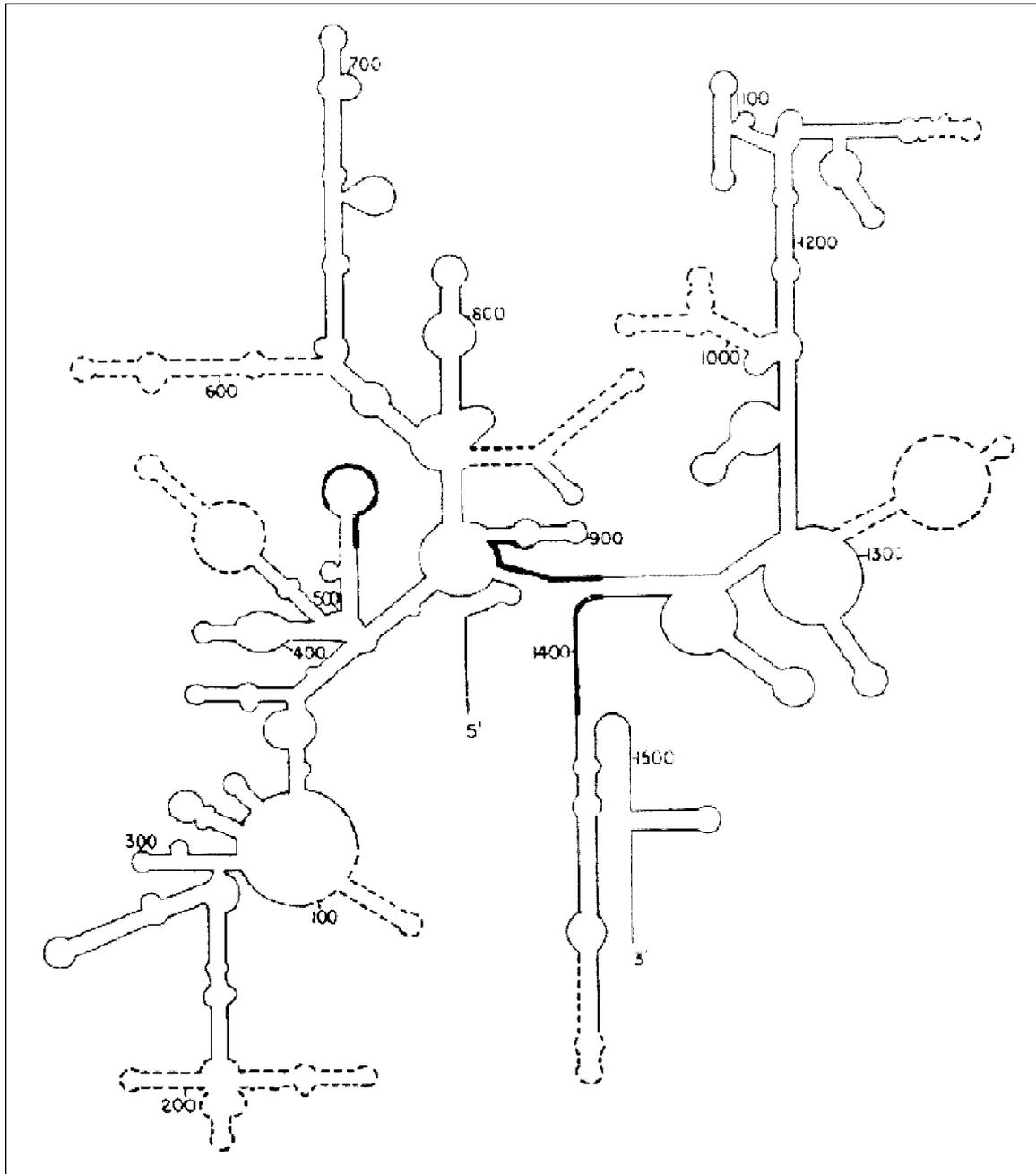
### 2.1. Analyse von Bakterien-Isolaten auf Speziesebene durch ARDRA (Amplified Ribosomal DNA - Restriction Analysis)

Mit Hilfe des ARDRA-Verfahrens (Vaneechoutte *et al.*, 1992) können von Bakterien Muster (genetische Fingerprints) erzeugt werden, die Rückschlüsse auf die Spezies-Zugehörigkeit erlauben. Dies ist möglich, da Gruppen von Bakterien mit sehr ähnlicher Sequenz der ribosomalen RNA in vielen Fällen mit Spezies-Gruppierungen übereinstimmen, die mit klassischen taxonomischen Verfahren (Analyse phänotypischer, biochemischer Eigenschaften; numerische Taxonomie) erhalten wurden. Darüberhinaus werden die mit den klassischen Verfahren erhaltenen Spezies-Gruppierungen heute häufig durch Analyse der rRNA-Sequenzen korrigiert, um eine phylogenetisch sinnvolle Systematik zu erzielen. Je nach Bakteriengruppe liegt die Auflösung der 16S rRNA-Sequenzanalyse höher als die vorhandene Speziesgruppierung (innerhalb einiger *Pseudomonas-Spezies*) oder auch niedriger (über einige Enterobakterien-**Gattungen** hinweg).

Die Sequenzierung der 16S rRNA vieler Isolate zur Identifizierung ist weder praxisgerecht noch sinnvoll. Meist reicht es, einige wenige Regionen der 16S rRNA zu analysieren, um eine tragfähige Aussage zu erhalten. Dies leistet das ARDRA-Verfahren, bei dem eine Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA durchgeführt wird. Die Amplifikation der 16S rDNA wird dadurch ermöglicht, daß diese hochkonservierte Bereiche enthält, die als Zielsequenzen für generell verwendbare PCR-Primer verwendet werden können (Abb. 1). Nach Amplifikation einer 16S rDNA-Region werden die

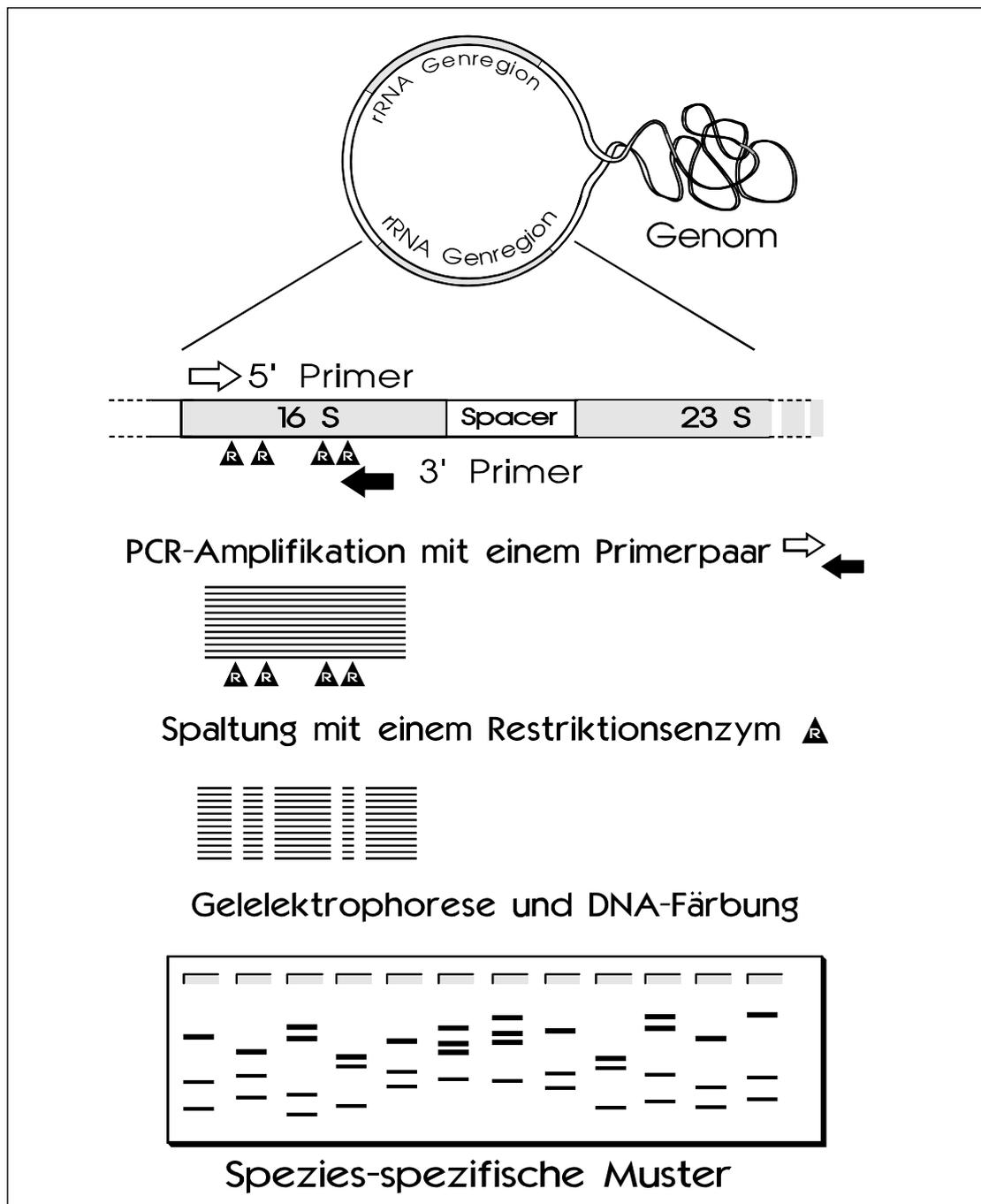
Produkte mit einem Restriktionsenzym geschnitten und die Subfragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wird die Spezies-spezifische Information, die in den variablen Bereichen der 16S rDNA (V1 bis V 9; Abb. 1) zu finden ist, ausgewertet.

Nach Anfärben der DNA-Fragmente im Gel erhält man Bandenmuster, die durch den Vergleich mit Mustern von parallel analysierten Referenzstämmen (bzw. gespeicherten Referenzmustern, s. u.) eine schnelle Spezies-Überprüfung von Mikroorganismen-Isolaten ermöglichen (Abb. 2).



**Abb. 1**

Sekundärstruktur-Modell der bakteriellen 16S rRNA. Konservierte Regionen sind durch dicke Linien markiert. Gestrichelte Linien bezeichnen variable Bereiche (aus Ward, 1989).



**Abb. 2** Restriktionsanalyse von amplifizierter rDNA. Mit Hilfe von PCR-Primern, die zu konservierten Bereichen in dem Gen für die 16S rRNA homolog sind, wird ein Teil der 16S rDNA amplifiziert. Anschließend werden die PCR-Produkte mit einem Restriktionsenzym gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und das Bandenmuster durch Färbung sichtbar gemacht. Man erhält Informationen über die Spezies-Zugehörigkeit der untersuchten Bakterienstämme.

Wenn Isolate von Bakterien durch Verfahren mit hoher Auflösung untersucht werden sollen, um damit einzelne Stämme voneinander zu unterscheiden (Typisierung), muß vorher sichergestellt sein, daß alle in der Analyse untersuchten Stämme zu ein und derselben (Geno-) Spezies gehören. Hier ist die ARDRA Technik besonders wertvoll, da