

Professor Dr. Kornelia Smalla
Julius Kühn-Institut
Messeweg 11-12
38104 Braunschweig

Forschungszentrum Jülich
Projektträger (PTJ)
z. Hd. Herrn Dr. P.-F. Langenbruch
52425 Jülich

Braunschweig, 28.05.2009

Abschlussbericht:

BMBF-Schwerpunkt: „Biologische Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen“

Forschungsverbund:

Einfluss des Anbaus transgener Kartoffeln auf die Qualität von landwirtschaftlich genutzten Böden (Förderkennzeichen: 0313277)

Teilprojekt: Einfluss des Anbaus von transgenen Kartoffeln auf die funktionelle und strukturelle Diversität von Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre-assoziierten Bakterien und Pilzen, insbesondere auf deren antagonistisches Potential (Förderkennzeichen: 0313277B)

Antragsteller: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (heutiges Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen)

Laufzeit: 01.04.2005 – 31.03.2008 (kostenneutral verlängert bis 31.07.2008)

1. Bericht – Projektziele

1.1. Aufgabenstellung:

Mit dem Teilprojekt sollten mögliche Effekte des Anbaus von Zeaxanthin produzierenden transgenen Kartoffeln auf die strukturelle und funktionelle Diversität von Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre-assoziierten Bakterien und Pilzen, insbesondere auf deren antagonistisches Potential untersucht werden. An zwei Standorten sollten transgene Zeaxanthin produzierende Linien, die Ausgangslinie und vier weitere konventionelle Kartoffelsorten angebaut werden. Der experimentelle Ansatz zur Untersuchung möglicher Effekte auf die Bodenmikroflora umfasste kultivierungsabhängige und -unabhängige Methoden. Die Untersuchung der Funktionalität der Mikroflora, insbesondere des antagonistischen Potentials, stand im Vordergrund. Basierend auf der Hypothese, dass durch die Reduzierung der Zeaxanthin-Epoxydase neben der Zeaxanthin-Produktion weitere Stoffwechselforgänge sowie die Wurzelexsudation der Kartoffel beeinflusst werden, sollte untersucht werden, inwieweit dadurch die funktionelle und strukturelle Diversität der Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre bei Zeaxanthin-Kartoffeln im Vergleich zur transgenen Kontrolle und zur nichtveränderten Ausgangssorte verändert wird. Weiterhin sollte die Hypothese, dass Unterschiede zwischen der Ausgangssorte und der gentechnisch veränderten Linie nicht größer sind als übliche Sorteneffekte, getestet werden. Es sollte eine Kombination aus etablierten methodischen Ansätzen (Screening antagonistischer Isolate, DGGE von 16S bzw. 18S rRNA-Genfragmenten) und neuen Monitoring-Methoden (Gene arrays) eingesetzt werden, die zum Teil deutlich empfindlicher als bislang genutzte Ansätze sind. Durch das geplante Versuchsdesign sollte es möglich werden, folgende Effekte und Einflussgrößen vergleichend zu analysieren:

- Effekte klassischer Sorten vs. Effekte transgener Linien
- Effekte unterschiedlicher transgener Linien mit dem gleichen Phänotyp
- Variabilität innerhalb einer Vegetationsperiode zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanze
- Einfluss des Standortes.

Als Modell für die Beantwortung dieser Fragen dienten zwei transgene Kartoffellinien, die so verändert wurden, dass Zeaxanthin in den Knollen angereichert wird. Da gerade in Industrieländern ein Großteil der Bevölkerung bedingt durch falsche Ernährung an einer Unterversorgung mit Zeaxanthin leidet, was hier zu einer Zunahme an Altersblindheit geführt hat, sollten die beiden untersuchten Linien als „Designer Food“ Anwendung finden;

entsprechende Vorversuche waren zu Beginn des Projektes erfolgreich abgeschlossen worden.

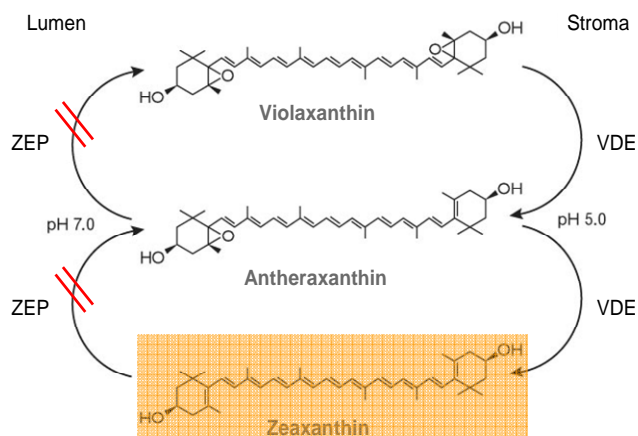
1.2. Die transgenen Kartoffellinien

Die gentechnische Veränderung der Zeaxanthin-Kartoffel beruht auf einer Übertragung des cDNA-Fragments der Zeaxanthin-Epoxydase. Die Expression findet unter Kontrolle des knollenspezifischen GBSS-Promotors und des Terminators des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens* statt. Das Genfragment wurde sowohl in sense- als auch antisense-Orientierung übertragen. Die resultierende Ko-Suppression (sense SR47) bzw. Antisense-RNA (antisense SR48) führt zu einer Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichts der Carotinoide vom Violaxanthin zum Zeaxanthin in den Knollen (Abbildung 1). 'Northern Blot'-Analysen zeigten, dass es in den gentechnisch veränderten Kartoffelknollen zu einer deutlichen Reduktion der Zeaxanthin-Epoxydase kommt. Trotz des knollenspezifischen GBSS-Promotors wurde jedoch auch bereits in den Blättern eine mäßige Reduktion der Zeaxanthin-Epoxydase beobachtet. Da Violaxanthin für die Biosynthese von Abszisinäure, einem Phytohormon, das verschiedene physiologische Prozesse in der Pflanze steuert, benötigt wird, war eine Beeinflussung anderer Stoffwechselprozesse durch die gentechnische Veränderung zu Projektbeginn nicht auszuschließen (Freisetzungsantrag; Aktenzeichen 6786-01-0135).

1.3. Felddesign und Probenahmen

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts wurde durch den Koordinator Dr. Michael Schlöter und Prof. Dr. G. Wenzel (Technische Universität München) die Durchführung der Feldversuche geplant und entsprechende Freisetzungsanträge für die beiden transgenen, Zeaxanthin-überproduzierenden Linien (SR47 und SR48) vorbereitet und gestellt. Ursprünglich waren Freisetzungen 2005, 2006 und 2007 an den Standorten in Roggenstein und Oberviehhausen geplant. Durch zeitliche Verzögerungen während der Antragsstellung fanden Freisetzungen von SR47 und SR48 in Roggenstein 2005 und 2007 sowie in Oberviehhausen 2006 und 2007 statt. Die Feldversuche wurden von J. Dennert in Roggenstein (Oberbayern) und X.F. Maidl in Oberviehhausen (Niederbayern) entsprechend der üblichen landwirtschaftlichen Praxis betreut.

Die zwei transgenen Linien sowie die Ausgangssorte ‚Baltica‘, die Sorten ‚Désirée‘, ‚Selma‘, ‚Ditta‘ (jeweils Speisekartoffeln) und ‚SIBU‘ (Industriestärkekartoffel) wurden entsprechend dem in Abbildung 2 dargestellten Felddesign in einer randomisierten Plot-Anlage mit sechs Wiederholungen pro Sorte/Linie angebaut und zu drei Zeitpunkten (EC30, EC60, EC90) während der Vegetationsperiode beprobt.



VDE, Violaxanthin-Deepoxidase; ZEP, Zeaxanthin-Epoxidase

Abbildung 1: Stoffwechselwege, die zur Bildung bzw. zum Abbau von Zeaxanthin in Kartoffeln führen

Die TU München hat bereits seit 1993 Freisetzungsversuche mit transgenen landwirtschaftlichen Kulturpflanzen für verschiedene Forschungseinrichtungen und Firmen (Fa. PLANTA GmbH, Fa. SakaRagis, Universität Göttingen, Universität Tübingen, GSF Neuherberg, BBA Braunschweig) durchgeführt. Dabei standen Untersuchungen mit transgenen Zuckerrüben und Kartoffeln im Mittelpunkt der Arbeiten, und so lagen umfangreiche Erfahrungen in der Durchführung von Versuchen mit landwirtschaftlichen Kulturpflanzen und insbesondere auch mit Freisetzungsversuchen von transgenen Pflanzen vor. Die Projektleiterin Frau Prof. Dr. Smalla sowie Frau Prof. Dr. Berg hatten durch verschiedene BMBF-, aber auch DFG-geförderte Projekte Erfahrungen mit der Analyse der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften in der Rhizo- und der Geocaulosphäre. Im Rahmen dieses Verbundprojekts wurden die bakteriellen Gemeinschaften in der Arbeitsgruppe Smalla (Braunschweig) und die pilzlichen Gemeinschaften in der Arbeitsgruppe Berg (Graz, Österreich) untersucht. Für die Durchführung der Array-Untersuchungen war die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Zhou (Oklahoma, USA) und Prof. Dr. G. Anderson (Berkeley, USA) wesentlich.

1.4. Planung und Ablauf des Vorhabens:

Freilandversuch

Um die Frage zu beantworten, inwieweit sich standortspezifische Eigenschaften (Bodentyp, Witterung, Pflanzenschutz) auf die zu untersuchenden Parameter auswirken, wurden zwei Standorte ausgewählt: Im Jahr 2005 wurde für die Versuche ein bereits bestehender

Freisetzungsversuch auf dem Versuchsgut in Roggenstein (Landkreis Fürstenfeldbruck) genutzt. Auf einer Versuchsfläche von 5.400 m² wurden hier ca. 1.500 transgene Knollen von zwei verschiedenen Linien (SR47 und SR48) sowie die nicht-transgene Ausgangssorte ‚Baltica‘ und die Vergleichssorten ‚SIBU‘, ‚Désirée‘, ‚Ditta‘ und ‚Selma‘ angebaut. Im Versuchsjahr 2006 sollte ein zweiter Freisetzungsstandort in Oberviehhausen (Landkreis Deggendorf) verfügbar sein. Somit sollte 2007 die Freisetzung parallel an zwei Standorten erfolgen. Für die Durchführung der Versuche wurde eine Versuchsanlage mit randomisiertem Blockdesign an beiden Standorten gewählt (Abbildung 2).

Probenahmen erfolgten an beiden Standorten (Roggenstein und Oberviehhausen) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Kartoffeln zu drei Terminen in der Vegetationsperiode (im ersten Projektjahr nur Roggenstein):

- PN1: ca. Ende Mai/Juni (Makrostadium 1, Blattentwicklung, keine Knollenbildung)
- PN2: im Juli (Makrostadium 6, Blüte, ca. 30% der Knollenmasse)
- PN3: Ende September (Makrostadium 9, Absterben der Pflanze, Knollen schalenfest und voll ausgebildet).

Die Definition der Makrostadien erfolgte nach Hack et al. (1993).

Die Probennahmen erfolgten jeweils getrennt nach Blöcken, so dass jeweils maximal sechs echte Replikate analysiert werden konnten. Aus jedem Block wurde eine Sammelprobe von jeweils 3-5 Pflanzen genommen (abhängig vom Entwicklungsstadium; PN1: 5 Pflanzen, PN2+3: 3 Pflanzen). Für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre wurden die Pflanzen mit einer Grabegabel vorsichtig aus dem Boden entfernt, geschüttelt, um lose anhaftenden Boden abzutrennen. Die vollständigen Wurzeln von 3-5 Pflanzen wurden zerschnitten und gemischt. Ein Teil wurde sofort vor Ort in flüssigem Stickstoff und Trockeneis eingefroren. Für die kultivierungsabhängige und -unabhängige Analyse (AG Smalla und AG Berg) wurden 10 g Wurzel mit 30 ml sterilem Milli-Q Wasser in einem Stomacher-Beutel re-suspendiert und mit Hilfe eines Stomachers mechanisch die an den Wurzeln anhaftenden Mikroorganismen abgelöst. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Ein Milliliter der ca. 100 ml Suspension wurde nach serieller Verdünnung im Doppel auf R2A-Medium und SNA ausgestrichen. Nach hochtouriger Zentrifugation der Mikroorganismen-Suspension wurde das Zellpellet gewonnen. Von diesem Mikroorganismen-Pellet wurden 0.5 g zur Extraktion der Gesamt-DNA mit Hilfe des BIO101 Kits genutzt. Die erhaltene „total community“ DNA wurde mit dem Gene Clean Kit gereinigt

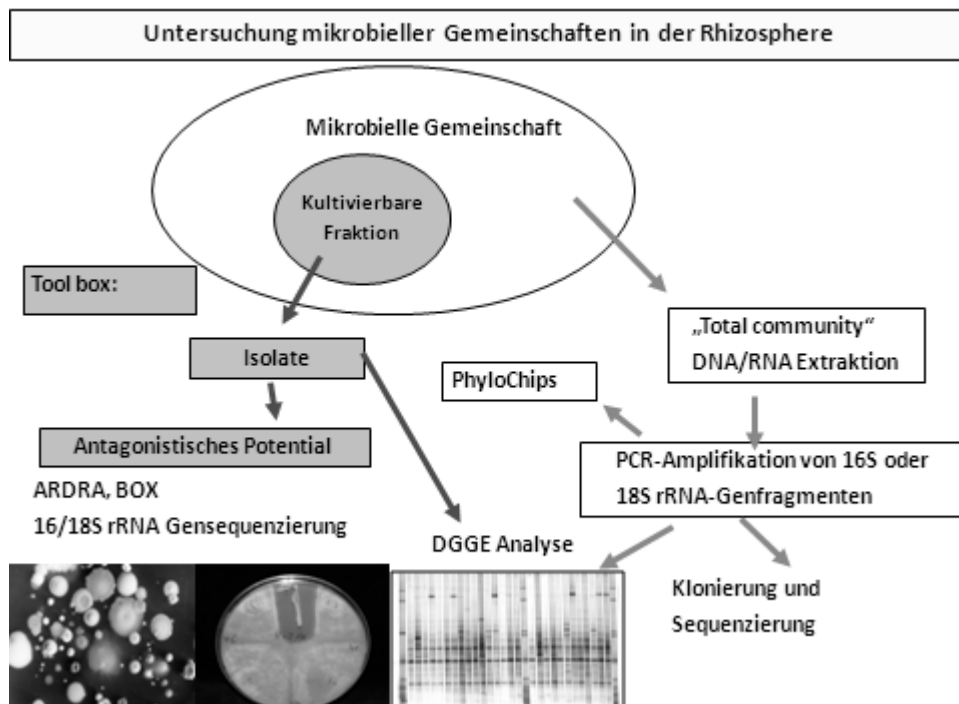
und als Template-DNA für nachfolgende PCR-Amplifikationen genutzt. Das methodische Herangehen in diesem Projekt des Verbundvorhabens ist in Abbildung 3 dargestellt.

15 m Protection planting. Every Plot has 4 Rows.				
Block 1 9 m(30 Tuber×0.3 m)	3 m Edge	Block 2 9 m(30 Tuber×0.3 m)	3 m Edge	Block 3 9 m(30 Tuber×0.3 m)
Plot1 Baltica		Plot15 Ditta		Plot29 Sibu
Plot2 SR 47/00#18		Plot16 Desiree		Plot30 Baltica
Plot3 Ditta		Plot17 Sibu		Plot31 Selma
Plot4 SR 48/00#17		Plot18 Baltica		Plot32 Ditta
Plot5 Sibu		Plot19 SR 47/00#18		Plot33 SR 48/00#17
Plot6 Selma		Plot20 SR 48/00#17		Plot34 Desiree
Plot7 Desiree		Plot21 Selma		Plot35 SR 47/00#18
Plot8 Sibu		Plot22 SR 48/00#17		Plot36 Desiree
Plot9 Selma		Plot23 SR 47/00#18		Plot37 Sibu
Plot10 SR 48/00#17		Plot24 Selma		Plot38 SR 47/00#18
Plot11 Desiree		Plot25 Baltica		Plot39 Baltica
Plot12 Baltica		Plot26 Sibu		Plot40 Ditta
Plot13 SR 47/00#18		Plot27 Ditta		Plot41 SR 48/00#17
Plot14 Ditta		Plot28 Desiree		Plot42 Selma

15 m Protection planting.

Abbildung 2: Randomisiertes Blockdesign der Versuchsanlage

Abbildung 3: Tool Box



1.5. Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

Bakterien besitzen im Boden und in der Rhizosphäre eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Funktionen. Neben den essentiellen Umsetzungen z.B. bei der Mineralisierung von abgestorbenem organischem Material, ohne die funktionierende Stoffkreisläufe nicht möglich wären, können sie unterschiedliche Interaktionen mit Pflanzen eingehen. Die Interaktionen der unterschiedlichen Bakteriengruppen untereinander sowie mit ihren Wirtspflanzen sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Pflanzenassoziierte Bakterien können positive, neutrale sowie negative Auswirkungen auf die Pflanzen haben. Positiv wirken sich z.B. Funktionen wie Nährstoffmobilisierung und Stickstofffixierung aus. Zudem ist häufig eine wachstumsfördernde Wirkung auf Pflanzen, z.B. durch die Produktion von Phytohormon-ähnlichen Verbindungen, und eine antagonistische Wirkung auf andere Mikroorganismen, z.B. durch die Exkretion von antibiotisch aktiven Sekundärmetaboliten oder extrazellulären Enzymen, zu beobachten.

Pilze stellen in terrestrischen Ökosystemen die größte und gleichzeitig eine hochgradig diverse phylogenetische Gruppe von Organismen dar, die für essentielle Funktionen verantwortlich ist. Sie bilden die wichtigste Gruppe der Destruenten im Boden, was ihre fundamentale Bedeutung im Kohlenstoffzyklus begründet. Pilze sind deshalb besondere Indikatoren für die Bodenfruchtbarkeit bzw. die Stabilität des Ökosystems Boden (Carroll & Wicklow 1992). Auf Grund ihrer Physiologie sind Pflanzen mit einer Vielzahl von Pilzen assoziiert. Ihre Interaktion mit der Pflanze reicht von symbiotisch bis pathogen. Pathogene Pilze sind für die Vernichtung von bis zu einem Drittel der Welternte jährlich verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist eine Vielzahl symbiotischer Interaktionen bekannt. Pilze bilden mit Pflanzen Mykorrhizen aus, die eine sehr enge physiologische und morphologische Verflechtung beider Partner darstellen (Vandenkoornhuyse et al. 2003b). Eine wichtige Gruppe mit positiver Pflanzeninteraktion stellen antagonistisch wirksame Pilze dar. Antagonisten sind in der Lage, das Wachstum phytopathogener Organismen einzugrenzen, und sind somit sehr wichtig für die Pathogenabwehr der Pflanzen. Trotz dieser wichtigen Funktion ist die Diversität von Pilzen in naturnahen Ökosystemen bislang wenig verstanden (Vandenkoornhuyse et al. 2003a). Hawksworth und Rossmann (1997) beziffern den Anteil der beschriebenen Pilzspezies auf bislang 5%, was im Vergleich zu den anderen Organismengruppen außerordentlich gering ist und auf eine große, unentdeckte Vielfalt schließen lässt. Gründe hierfür liegen in der schwierigen Kultivierbarkeit vieler Pilzgruppen, insbesondere der symbiotisch lebenden. In den letzten Jahren wurden kultivierungsunabhängige Techniken zur Analyse der pilzlichen Diversität entwickelt und erfolgreich angewendet, die einen ersten Einblick in die Diversität pflanzenassoziiierter Pilze erlauben (Kowalchuk 1999, 2002, Ranjard et al. 2001, Gomes et al. 2003).

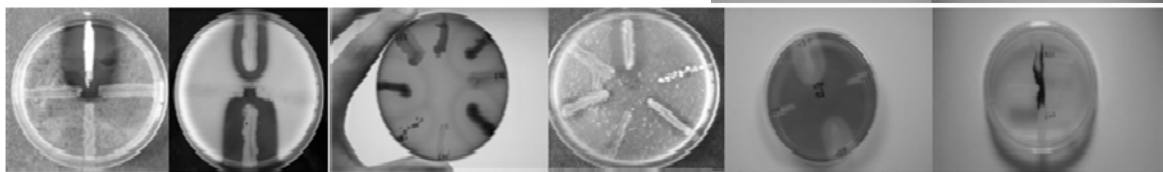
Pilze der Gattung *Trichoderma/Hypocrea* (Ascomycetes) sind Modellorganismen für pflanzenassoziierte Pilze mit positiver Wirkung auf die Wirtspflanzen, aber sie können auch von nahezu jedem Boden isoliert werden und dienen hier als Indikatororganismen (Harman et al. 2004; Berg et al. 2005; Kubicek et al. 2008). Ihre positive Pflanzeninteraktion beruht zum einem auf der antagonistischen Aktivität gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen, wie z.B. *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Phytophthora cactorum*, *Phytium* spp., *Rhizoctonia solani* und *Verticillium dahliae* (Weinling, 1932; Chet, 1987; Grosch et al. 2006) und auf der anderen Seite auf der pflanzenwachstumsfördernden Wirkung (Inbar et al. 1994). Letztere beruht auf der Pflanzenhormonproduktion (Contreras-Cornejo et al. 2009), während in die antifungische Aktivität mehrere Mechanismen involviert sind (Harman et al. 2004). Aufgrund ihrer Wirkungsweise sind bereits mehrere Stämme als biologische Präparate kommerzialisiert (Monte, 2001; Hermosa et al. 2004). Aufgrund der enormen Bedeutung sind in den letzten Jahren einige Studien zur Ökologie von *Trichoderma* erschienen; diese beruhen jedoch auf kultivierungsabhängigen Untersuchungen (Zangh et al. 2005; Migheli et al. 2009; Sadfi-Zouaoui et al. 2009). Hagn et al. (2007) entwickelten *Trichoderma*-spezifische Primer, die zur molekularen Charakterisierung von *Trichoderma*-Populationen eingesetzt werden können (Zachow et al. 2009); allerdings gestatten sie eine anschließende Identifizierung mit den Systemen TrichoKey 2.0 (Druzhinina et al. 2005) und TrichoBlast (Kopchinskiy et al. 2005) nicht, da hier ein anderer Abschnitt der ITS-Sequenz zu Grunde liegt.

Die Rhizosphäre, der von den Wurzeln beeinflusste Bereich im Boden, begünstigt eine angepasste mikrobielle Gemeinschaft, die sich vom wurzelfreien Boden deutlich unterscheiden kann (Brimecombe et al. 2001, Gomes et al. 2001, 2003). Durch die sogenannten „rhizodeposits“, die u.a. aus Lysaten abgestorbener Wurzelzellen oder Wurzelexsudate, die aktiv (Sekretion) oder passiv (Diffusion) von Wurzelzellen in den Boden entlassen werden, bestehen, ist die Abundanz und metabolische Aktivität bestimmter Mikroorganismen in der Rhizosphäre erhöht (Lynch und Whipps 1991, Siciliano et al. 1999). Auf Grund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Wurzelexsudate unterschiedlicher Pflanzenarten (Sørensen 1997, Neumann und Römheld, 2001; Brimecombe et al. 2001; Berg und Smalla, 2009) sind pflanzenspezifische Mikroorganismengemeinschaften der Rhizosphäre zu finden (Weller 1988, Smalla et al. 2001, Berg et al., 2002). Die Anreicherung von bestimmten Mikroorganismengruppen in der Rhizosphäre einer Pflanzenart kann sich auch auf die Folgepflanzen positiv oder negativ auswirken, sie könnte aber auch zu einer nachhaltigen Beeinflussung der Bodenqualität führen. Die Rhizodeposition wird u.a. durch den physiologischen Zustand der Pflanze beeinflusst (Neumann und Römheld, 2001).

Die Bewertung möglicher Effekte transgener Pflanzen auf mikrobielle Gemeinschaften war bis Mitte der 90er Jahre sehr begrenzt möglich, da traditionelle mikrobiologische Kultivierungstechniken nur einen sehr geringen Teil der Bakterien und Pilze in der Rhizosphäre erfassen. Mit der Entwicklung kultivierungsunabhängiger Methoden wurde es auch möglich, Informationen über die große Mehrheit der nicht kultivierbaren oder nur langsam wachsenden Mikroorganismen zu erhalten. Erst die Entwicklung von Methoden zur direkten Extraktion von DNA oder RNA aus dem Boden bzw. aus dem Rhizosphärenpellet in Kombination mit der PCR-Amplifikation von 16S rRNA bzw. 18S oder ITS-Fragmenten und deren Analyse mit Fingerprinting-Techniken schaffte die Voraussetzungen für die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften, wie sie im Rahmen dieses Projekts angewendet werden sollten (Muyzer und Smalla, 1998; Prosser et al. 2002). Die Nutzung von Fingerprinting-Techniken ermöglicht die vergleichende Analyse großer Probenzahlen. Ziel ist nicht vorrangig die Untersuchung der Diversität, sondern die empfindliche Detektion von Bakterien- oder Pilzpopulationen, die auf eine Behandlung durch eine Änderung ihrer relativen Abundanz reagieren. Solche zu den Unterschieden beitragenden Populationen können durch Reamplifikation und Klonierung und Sequenzierung weiter charakterisiert werden (Lottmann et al. 2000; Milling et al. 2004). Da die Analyse von PCR-Produkten, die mit bakterien- oder pilzspezifischen Primern erhalten wurden, nur die Untersuchung der häufigsten (dominanten) Bakterien und Pilze zulässt, wurde außerdem eine Reihe von gruppenspezifischen PCR-Systemen genutzt und zum Teil in diesem Projekt neuentwickelt (Heuer et al. 1997; Gomes et al. 2001; Heuer et al. 2002; Costa et al. 2007). Für die statistische Analyse der Fingerprints wurde ein eigens entwickelter Permutationstest genutzt (Kropf et al. 2004). Während Fingerprinting-Methoden ausgezeichnet geeignet sind, behandlungsabhängige Effekte in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu detektieren, geben sie aber erst nach Sequenzierung entsprechender Banden Auskunft über die taxonomische Zusammensetzung. Um Informationen über die Diversität und taxonomische Zugehörigkeit der Bakterien in der Rhizosphäre von Kartoffeln zu erhalten, sind Methoden wie die Klonierung von PCR-amplifizierten 16S rRNA-Genfragmenten und anschließende Sequenzierung sowie die Nutzung von „high density arrays“ geplant. Während die Methode der Klonierung von PCR-amplifizierten 16S rRNA-Genfragmenten zum Zeitpunkt der Antragstellung bereits gut etabliert war, waren sowohl die PhyloChips als auch sogenannte funktionelle Genarrays im Labor von G. Andersen (Lawrence Berkeley National Laboratory) bzw. J. Zhou (University of Oklahoma) erst in der Entwicklung (Brodie et al., 2007; DeSantis et al., 2007; He et al., 2007). Durch Kooperationen sollte die Nutzung dieser innovativen Techniken auch im Rahmen dieses Projekts ermöglicht werden.

Da Sequenzinformationen nur begrenzt eine Abschätzung der potentiellen Eigenschaften dieser Populationen ermöglichen und wir uns in diesem Verbundprojekt auf die Bakterien

und Pilze mit antagonistischer Aktivität konzentrieren wollten, sollten trotz ihrer bekannten Nachteile traditionelle Kultivierungsverfahren genutzt werden, um den Anteil und die Diversität von Bakterienisolaten mit *in vitro*-Aktivität gegenüber *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* und *Phytophthora infestans* zu erfassen. Während die Dualtestung für *Rhizoctonia solani* und *Verticillium dahliae* bereits etabliert war (Berg et al. 2002), musste der Test für *Phytophthora infestans* noch etabliert werden. Methoden zur phäno- und genotypischen Charakterisierung von bakteriellen Antagonisten waren durch Berg et al. (2002) bereits gut etabliert.



Eine umfassende Literaturübersicht zur Bedeutung von Prokaryonten für die Qualität landwirtschaftlich genutzter Böden und zu Steuergrößen für die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in Böden wurde im Abschlussbericht von Dr. Schlöter gegeben.

1.6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Gesamtvorhaben war ein Verbund zwischen der TU München (mit Unterauftrag an die Universität Hohenheim) und der BBA (jetzt Julius Kühn-Institut; Prof. Kornelia Smalla) in Braunschweig (mit Unterauftrag an die TU Graz). Der Verbund wurde von der TU München koordiniert. Während in diesem Teil des BMBF-Verbunds die Pflanzenentwicklung und der Einfluss der transgenen Linien bzw. der konventionellen Sorten auf Stoffumsetzungen in der Rhizosphäre und Residusphäre im Vordergrund standen, wurden im Teilprojekt Smalla (JKI) und Berg (TU Graz) Effekte transgener Kartoffeln auf die bakteriellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre und in der Geocaulosphäre mit besonderem Fokus auf potentiell antagonistische Populationen untersucht.

Eine Zusammenarbeit für die Nutzung von PhyloChips und den „functional gene arrays“ wurde mit zwei US-amerikanischen Arbeitsgruppen genutzt (Prof. Dr. J. Zhou, University of Oklahoma; Prof. Dr. Gary Andersen, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley). Weiterhin wurde immer wieder die Expertise der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kropf (Universität Magdeburg) und von Dr. H. Heuer (JKI) für die biometrische Analyse der Daten herangezogen.

2.1. Ergebnisse Bakterien

2.1.1. Einfluss des Anbaus der transgenen Linien auf die funktionelle Diversität bakterieller Antagonisten in der Rhizosphäre

Potentielle Effekte des Anbaus der transgenen Kartoffellinien auf die funktionelle Diversität bakterieller Gemeinschaften können im Hinblick auf bestimmte Indikatorgruppen untersucht werden, denen wichtige Funktionen in der Rhizosphäre zukommen. Zu diesen Indikatorgruppen zählen bakterielle Antagonisten gegen Pflanzenpathogene, die eine entscheidende Rolle für die Pflanzengesundheit in Agrarökosystemen spielen. Ein Teil dieses Projekts untersuchte daher die potentiellen Effekte des Anbaus der transgenen Zeaxanthin-Kartoffellinien auf das Vorkommen und die Diversität bakterieller Antagonisten in der Rhizosphäre. Dafür wurde ein kultivierungsabhängiger Untersuchungsansatz gewählt und serielle Verdünnungsreihen der von den Wurzeln mit anhaftendem Boden abgelösten Mikroorganismen auf R2A-Medium plattiert und nach Inkubation bei 28°C die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units, CFU) bestimmt (Tabelle 1). Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede ($p \leq 0.05$) zum Zeitpunkt EC60 in Roggenstein (2005) und für die Zeitpunkte EC30 und EC60 in Oberviehhausen (2006). Diese Unterschiede traten sowohl zwischen den transgenen Linien und einigen kommerziellen Sorten als auch zwischen verschiedenen kommerziellen Sorten auf.

Von diesen Verdünnungsreihen wurden für den Standort Roggenstein im Jahr 2005 und für den Standort Oberviehhausen im Jahr 2006 zu jedem der drei Probenahmezeitpunkte von allen sieben Kartoffelgenotypen jeweils 100 Bakterienkolonien gepickt. Die gewonnenen Isolate wurden im Folgenden mit Hilfe eines Dualkulturtests auf ihr *in vitro* antagonistisches Potential gegen drei bedeutende Kartoffelpathogene (*Rhizoctonia solani* AG-3, *Verticillium dahliae* V25 und *Phytophthora infestans* [Mont.] De Bary) getestet (Abbildung 4).

Tabelle 1: Durchschnittswerte (\log_{10}) der Kolonie-bildenden Einheiten pro g Wurzelfrischmasse aus der Kartoffelrhizosphäre für die Standorte Roggenstein (A) und Oberviehhausen (B) für die drei Probenahmezeitpunkte. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$) nach dem Tukey-Test.

(A) Roggenstein

Sorte/transgene Linie	EC30	EC60	EC90
	\log_{10} CFU	\log_{10} CFU	\log_{10} CFU
'Baltica'	6.99 ± 0.34 (a)	7.44 ± 0.09 (cb)	6.98 ± 0.44 (a)
SR47	6.94 ± 0.24 (a)	6.95 ± 0.15 (a)	7.22 ± 0.54 (a)
SR48	6.99 ± 0.13 (a)	7.26 ± 0.09 (b)	7.24 ± 0.17 (a)
'Selma'	6.51 ± 0.25 (a)	7.25 ± 0.06 (b)	6.77 ± 0.06 (a)
'Désirée'	6.79 ± 0.39 (a)	7.56 ± 0.12 (c)	7.19 ± 0.32 (a)
'Ditta'	6.40 ± 0.28 (a)	7.57 ± 0.10 (c)	6.68 ± 0.32 (a)
'Sibu'	7.00 ± 0.21 (a)	7.57 ± 0.10 (c)	6.81 ± 0.11 (a)

(B) Oberviehhausen

Sorte/transgene Linie	EC30	EC60	EC90
	\log_{10} CFU	\log_{10} CFU	\log_{10} CFU
'Baltica'	7.53 ± 0.09 (abc)	7.40 ± 0.02 (abc)	7.52 ± 0.21 (a)
SR47	7.62 ± 0.15 (abc)	7.28 ± 0.09 (b)	7.38 ± 0.19 (a)
SR48	7.47 ± 0.09 (b)	7.37 ± 0.14 (abc)	7.32 ± 0.08 (a)
'Selma'	7.77 ± 0.07 (c)	7.51 ± 0.11 (abc)	7.51 ± 0.06 (a)
'Désirée'	7.55 ± 0.09 (abc)	7.52 ± 0.13 (ac)	7.38 ± 0.15 (a)
'Ditta'	7.53 ± 0.17 (abc)	7.41 ± 0.08 (abc)	7.53 ± 0.15 (a)
'Sibu'	7.39 ± 0.15 (ab)	7.52 ± 0.09 (ac)	7.33 ± 0.09 (a)

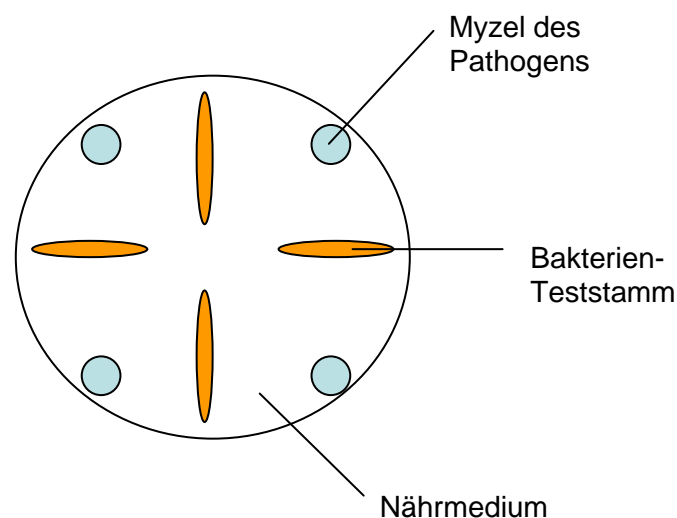


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Dualkulturtests für *Rhizoctonia solani* und *Phytophthora infestans*.

Für die Gesamtzahl der ermittelten Antagonisten aus der Rhizosphäre über alle drei Probenahmezeitpunkte ergaben sich zum Teil signifikante Unterschiede. Diese traten sowohl zwischen der Ausgangssorte ‚Baltica‘ und den transgenen Linien als auch zwischen verschiedenen kommerziellen Sorten auf. Für den Standort Roggenstein resultierten die signifikanten Unterschiede vor allem aus dem hohen Anteil der Antagonisten von der Sorte ‚Désirée‘ (Tabelle 2A). Insgesamt lag die Zahl der Antagonisten der transgenen Linien jedoch stets innerhalb der natürlichen Sortenvariabilität.

Tabelle 2: Anzahl der Isolate aus der Kartoffelrhizosphäre der Standorte Roggenstein (A) und Oberviehhausen (B) mit *in vitro* antagonistischer Aktivität gegen *Rhizoctonia solani* AG-3, *Verticillium dahliae* V25 und *Phytophthora infestans*.

(A)

Roggenstein

Sorte/transgene Linie	Anzahl getesteter Isolate	Gesamtzahl der Antagonisten EC30-EC90 ^a		
		<i>R. solani</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>P. infestans</i>
‚Baltica‘	283	17 (a)	11 (a)	37 (a)
SR47	288	26 (abd)	24 (bd)	44 (a)
SR48	286	14 (a)	16 (ab)	39 (a)
‚Selma‘	256	30 (bcd)	12 (ab)	34 (a)
‚Désirée‘	286	50 (c)	43 (c)	69 (b)
‚Ditta‘	272	20 (abd)	12 (ab)	41 (a)
‚Sibu‘	275	30 (d)	29 (cd)	52 (ab)
Gesamtzahl	1946	187	147	316

(B)

Oberviehhausen

Sorte/transgene Linie	Anzahl getesteter Isolate	Gesamtzahl der Antagonisten EC30-EC90 ^a		
		<i>R. solani</i>	<i>V. dahliae</i>	<i>P. infestans</i>
‚Baltica‘	297	12 (a)	18 (a)	65 (ab)
SR47	297	15 (ab)	21 (a)	60 (a)
SR48	298	24 (bc)	20 (a)	64 (ab)
‚Selma‘	299	35 (c)	24 (a)	80 (ab)
‚Désirée‘	250	19 (abc)	24 (a)	69 (ab)
‚Ditta‘	298	37 (c)	25 (a)	82 (b)
‚Sibu‘	300	31 (c)	22 (a)	67 (ab)
Gesamtzahl	2039	173	154	487

^a EC30 = junge Pflanze, EC60 = blühende Pflanze, EC90 = seneszente Pflanze

Die ermittelten Rhizosphärenisolate mit antagonistischer Aktivität wurden weiterhin sowohl phänotypisch als auch genotypisch charakterisiert. Die genotypische Charakterisierung erfolgte mittels ribosomaler Restriktionsanalyse (ARDRA), BOX-PCR-Fingerprints und partieller Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Antagonisten in Abhängigkeit vom Standort. Während Antagonisten vom Standort Roggenstein vorrangig der Gattung *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) (47.2%) zugeordnet werden konnten, gehörten Antagonisten vom Standort Oberviehhausen in erster Linie der Gattung *Streptomyces* (High G+C Gram-positives) (46.7%) und *Bacillus* (*Firmicutes*) (29.2%) an (Tabelle 3).

Tabelle 3: Phylogenetische Zuordnung der *in vitro*-Antagonisten der Standorte Roggenstein und Oberviehhausen durch partielle Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.

	<u>Roggenstein (n)</u>	<u>Oberviehhausen (n)</u>
<i>Gammaproteobacteria</i>	152 (66.4%)	69 (21.6%)
<i>Pseudomonas</i>	83	36
<i>Dickeya/Pectobacterium</i>	34	14
<i>Lysobacter</i>	12	17
<i>Acinetobacter</i>	13	0
<i>Stenotrophomonas</i>	0	1
<i>Serratia</i>	4	0
<i>Pantoea</i>	4	0
<i>Citrobacter</i>	1	0
<i>Enterobacter</i>	1	1
High G+C Gram-positives	50 (21.8%)	149 (46.7%)
<i>Streptomyces</i>	40	135
<i>Arthrobacter</i>	7	3
<i>Microbacterium</i>	3	1
<i>Amycolatopsis</i>	0	3
<i>Lentzea</i>	0	3
<i>Saccharothrix</i>	0	1
<i>Micromonospora</i>	0	1
<i>Promicromonospora</i>	0	1
<i>Nocardioides</i>	0	1
<i>Firmicutes</i>	24 (10.5%)	93 (29.2%)
<i>Bacillus</i>	13	87
<i>Paenibacillus</i>	11	0
<i>Brevibacillus</i>	0	3
<i>Staphylococcus</i>	0	3
<i>Betaproteobacteria</i>	1 (0.4%)	7 (2.2%)
<i>Delftia</i>	1	3
<i>Variovorax</i>	0	2
<i>Massilia</i>	0	1
<i>Janthinobacterium</i>	0	1
CFB group bacteria	2 (0.9%)	0
<i>Flavobacterium</i>	2	0

<i>Alphaproteobacteria</i>	0	1 (0.3%)
<i>Phyllobacterium</i>	0	1
Total number of isolates identified	229	319

Die phänotypische Charakterisierung der Antagonisten basierte auf der Untersuchung ihrer Fähigkeit, *in vitro* Glucanase, Cellulase, Protease und Chitinase zu bilden. Ferner wurde die Fähigkeit zur Produktion von Eisen-bindenden Siderophoren sowie zum Quorum sensing mit Hilfe von N-Acyl Homoserinlacton-Molekülen in Gegenwart von zwei Teststämmen untersucht. Obwohl eine Vielzahl der Antagonisten extrazelluläre Enzyme produzierte, zeigten sich Unterschiede zwischen den Standorten in erster Linie im Anteil der Antagonisten, die Glucanase oder Siderophoren bildeten (Abbildung 5). Diese Unterschiede spiegelten die phylogenetische Zusammensetzung der Antagonisten beider Standorte wider.

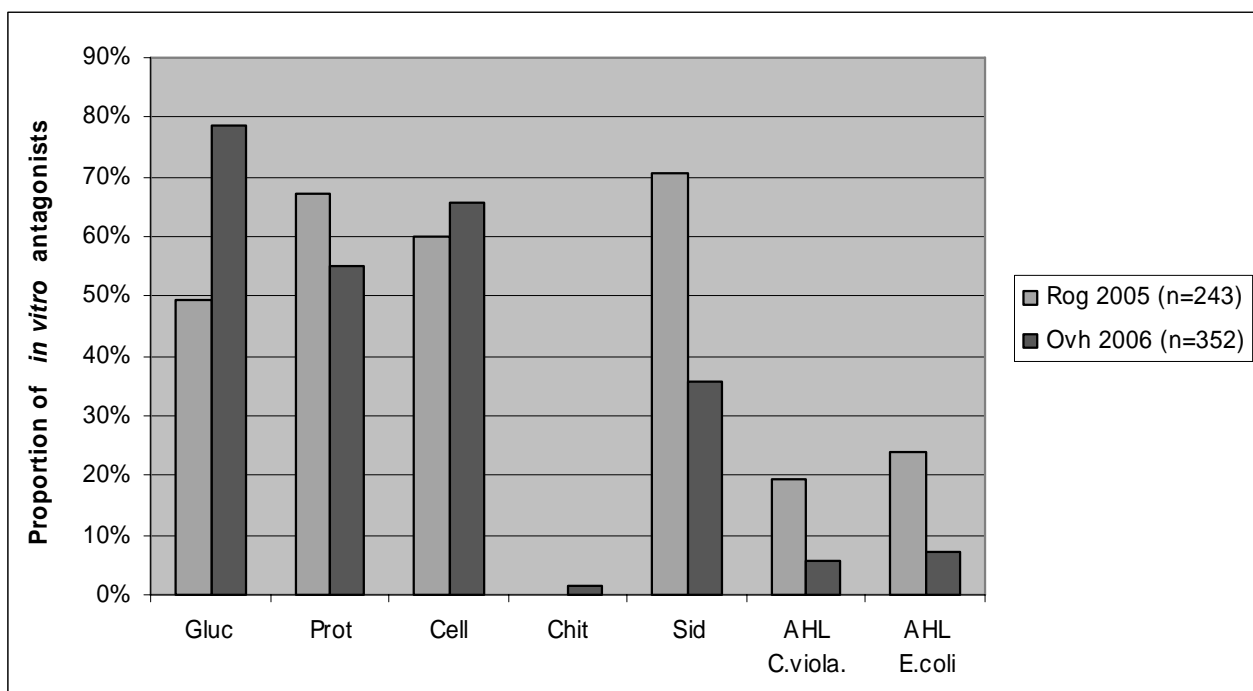


Abbildung 5: Anteil der *in vitro*-Antagonisten mit enzymatischer Aktivität an den Standorten Roggenstein (Rog) und Oberviehhausen (Ovh). Gluc: Glucanase; Prot: Protease; Cell: Cellulase; Chit: Chitinase; Sid: Siderophoren; AHL: N-Acyl Homoserinlacton-Produktion in Gegenwart von *Chromobacterium violaceum* CV026 bzw. *Escherichia coli* pSB403.

Die Untersuchung des Einflusses der transgenen Pflanzen auf die funktionelle Gruppe der Antagonisten zeigte, dass der Standort den größten Effekt auf den Anteil und die Diversität von Antagonisten in der Rhizosphäre hatte. Der Effekt der gentechnischen Veränderung der Pflanzen lag hingegen innerhalb der natürlichen Sortenvariabilität bezüglich des untersuchten Merkmals.

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden zur Veröffentlichung in „Plant and Soil“ akzeptiert und befinden sich im Druck (Anhang 3).

Weinert, N., R. Meincke, C. Gottwald, V. Radl, X. Dong, M. Schloter, G. Berg, and K. Smalla. 2009. Effects of genetically modified potatoes with increased zeaxanthin content on the abundance and diversity of rhizobacteria with *in vitro* antagonistic activity do not exceed natural variability among cultivars. Plant and Soil in press

2.1.2. Einfluss des Anbaus der transgenen Linien auf die strukturelle Diversität bakterieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre

Der Vergleich der strukturellen Diversität bakterieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre der transgenen Linien und kommerziellen Sorten erfolgte basierend auf der Analyse von 16S rRNA-Genfragmenten, die aus der Gesamt-DNA mit der PCR amplifiziert wurden, mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE). Zur Amplifikation wurden neben *Bacteria*-spezifischen Primern auch verschiedene Primer-Systeme verwendet, die die Anreicherung bestimmter taxonomischer Gruppen ermöglichen (*Alpha*- und *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Streptomycetaceae*, *Pseudomonas*). Zusätzlich wurde das *Pseudomonas*-spezifische *gacA* Gen (globaler response Regulator) aus der Gesamt-DNA amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Amplikons wurden mit Hilfe der DGGE aufgetrennt und die Fingerprints mit Hilfe des Permutationstests nach Kropf et al. (2004) statistisch ausgewertet. Dabei wurde zum einen auf signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der parentalen Ausgangssorte ‚Baltica‘ getestet und zum anderen auf signifikante Unterschiede zwischen allen sieben Kartoffelgenotypen.

Signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der parentalen Ausgangssorte ‚Baltica‘ konnten am Standort Roggenstein im Jahr 2005 für die *Actinobacteria* zu allen drei Probenahmezeitpunkten sowie für die *Streptomycetaceae* und die *Betaproteobacteria* zum Zeitpunkt EC90 gefunden werden (Tabelle 4). Am gleichen Standort im Jahr 2007, sowie am Standort Oberviehhausen im Jahr 2006 konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und ‚Baltica‘ detektiert werden.

Bei einem Vergleich aller sieben Kartoffelgenotypen zeigte sich, dass die genetischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Sorten einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften hatten als die gentechnische Veränderung der Pflanzen. Signifikante Unterschiede zwischen allen Genotypen waren prozentual größer und wurden zudem deutlich häufiger an beiden Standorten und in allen drei Jahren detektiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Prozentuale Unterschiede zwischen bakteriellen DGGE-Fingerabdrücken für den Vergleich von 'Baltica' mit den transgenen Linien und den Vergleich aller Kartoffelgenotypen.

DGGE Gel	Pflanzen- stadium	Roggenstein 2005 Vergleich			Oberviehhausen 2006 Vergleich			Roggenstein 2007 Vergleich		
		Baltica- transgene Linien		alle Genotypen	Baltica- transgeneLinien		alle Genotypen	Baltica- transgene Linien		alle Genotypen
<i>Bacteria</i>	EC30	0.4	4.4**	1.8	1.4	-	-	-	-	
	EC60	1.7	4.0**	0.0	1.2	0.0	0.0	0.8	0.8	
	EC90	0.6	13.1**	0.5	4.5**	0.0	0.0	0.9	0.9	
<i>Pseudomonas</i>	EC30	0.0	3.1**	0.0	0.2	-	-	-	-	
	EC60	0.1	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	
	EC90	0.2	2.4**	0.0	5.7**	0.0	0.0	1.4**	1.4**	
<i>gacA</i>	EC30	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-	-	-	
	EC60	0.2	0.0	0.1	0.3	0.0	0.0	3.8**	3.8**	
	EC90	0.0	5.1**	0.0	3.3*	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Actinobacteria</i>	EC30	2.6	6.4**	0.0	0.6	-	-	-	-	
	EC60	3.0	3.7**	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4*	1.4*	
	EC90	4.5	9.7**	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Streptomycetaceae</i>	EC30	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	
	EC60	0.5	0.1	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
	EC90	2.8	1.4	0.0	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	
<i>Alphaproteobacteria</i>	EC30	0.0	1.1*	1.8	0.0	-	-	-	-	
	EC60	0.0	0.7	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	EC90	0.0	1.4*	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Betaproteobacteria</i>	EC30	0.0	1.1	1.1	5.1**	-	-	-	-	
	EC60	4.6	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	EC90	2.8	3.1**	0.0	2.7**	0.0	0.0	0.0	0.0	
<i>Bacillus</i>	EC30	3.2	0.2	0.0	0.0	-	-	-	-	
	EC60	0.0	1.8*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	
	EC90	0.0	9.8**	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

*p ≤ 0.05

**p ≤ 0.01

Die Analyse aller DGGE-Fingerabdrücke für den jeweiligen Standort zeigte, dass die transgenen Linien im Allgemeinen ähnlicher zu ‚Baltica‘ waren als die kommerziellen Sorten (Abbildung 6). Am Standort Roggenstein lag das Konfidenzintervall der kommerziellen Sorten ‚Désirée‘ und ‚Sibu‘ außerhalb des Konfidenzintervalls der beiden transgenen Linien. Die beiden Sorten waren daher signifikant unterschiedlicher zu ‚Baltica‘ als die beiden transgenen Linien. Am Standort Oberviehhausen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien und den kommerziellen Sorten. Jedoch waren auch hier beide transgenen Linien ähnlicher zu ‚Baltica‘ als die kommerziellen Sorten.

Ein Vergleich der bakteriellen Gemeinschaften an beiden Standorten machte deutlich, dass Umweltfaktoren wie Standort oder Jahr einen größeren Effekt auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre hatten als der Pflanzengenotyp. Der Standortvergleich der Rhizosphärengemeinschaft der fünf Sorten im Jahr 2006 zeigte, dass sich die DGGE-Fingerabdrücke für *Pseudomonas*, *Streptomycetaceae* und *Bacillus* zum Zeitpunkt EC60 um 40%, 39% bzw. 15% unterschieden. Diese Unterschiede waren statistisch hoch signifikant ($p < 0.0001$). Ebenso zeigten sich signifikante Unterschiede für einen Vergleich der *Streptomycetaceae*- und *Bacillus*-Fingerabdrücke am Standort Roggenstein (2005) und Oberviehhausen (2006) zum Zeitpunkt EC60 (Abb. 7 b,c). Diese Fingerabdrücke unterschieden sich um 31% bzw. 34%. Im Gegensatz dazu unterschieden sich *Pseudomonas*-Fingerabdrücke für den Vergleich beider Standorte nur um 6% (Abb. 7 a).

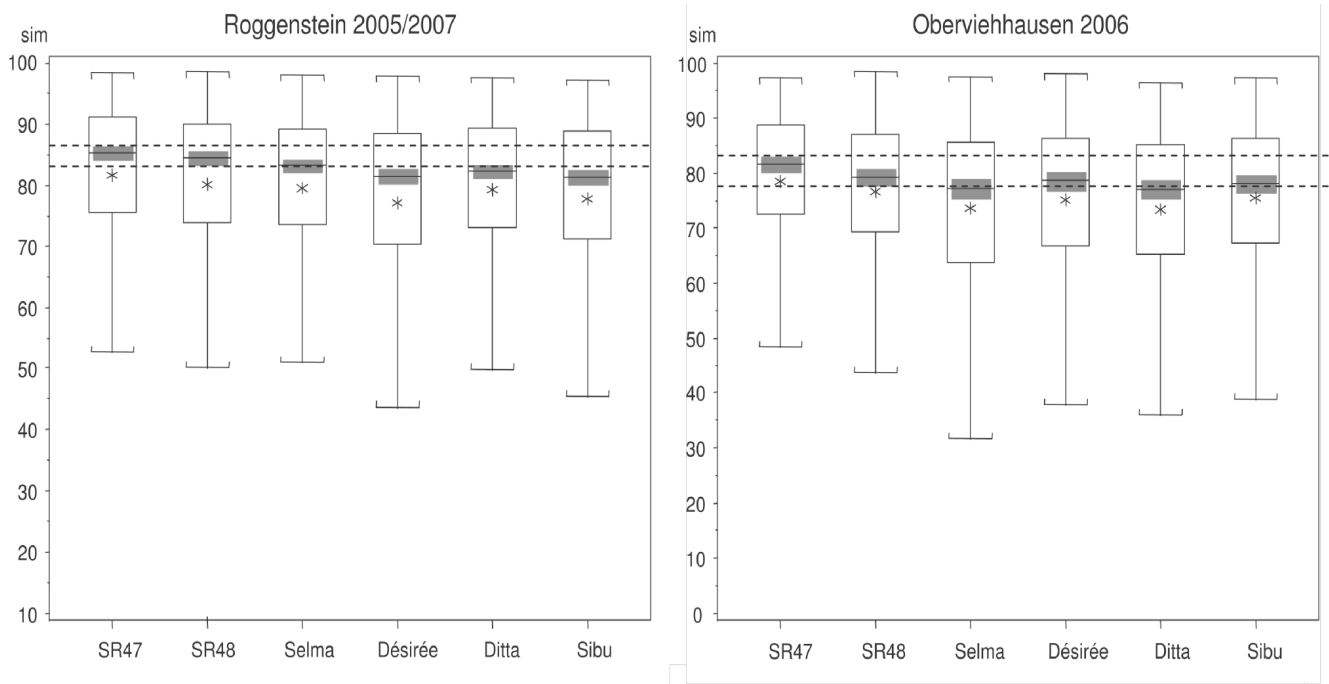


Abbildung 6: Ähnlichkeit der bakteriellen DGGE-Fingerabdrücke (*Bacteria*, *Actinobacteria*, *Alpha*- und *Betaproteobacteria*, *Bacillus*, *Streptomycetaceae*, *Pseudomonas*, *gacA*) der transgenen Linien und der kommerziellen Sorten zu ‚Baltica‘ (y-Achse) an den Standorten Roggenstein (2005 und 2007) und Oberviehhausen (2006), dargestellt als Box-Whisker plots. Dargestellt sind die Whisker-Linien (Extremwerte der Ähnlichkeit), der Median (schwarze Linie), das 95% Konfidenzintervall (graue Kästen) und der Mittelwert (Stern). Die gestrichelte Linie umfasst den Konfidenzintervallbereich der beiden transgenen Linien.

Abbildung 7 a)

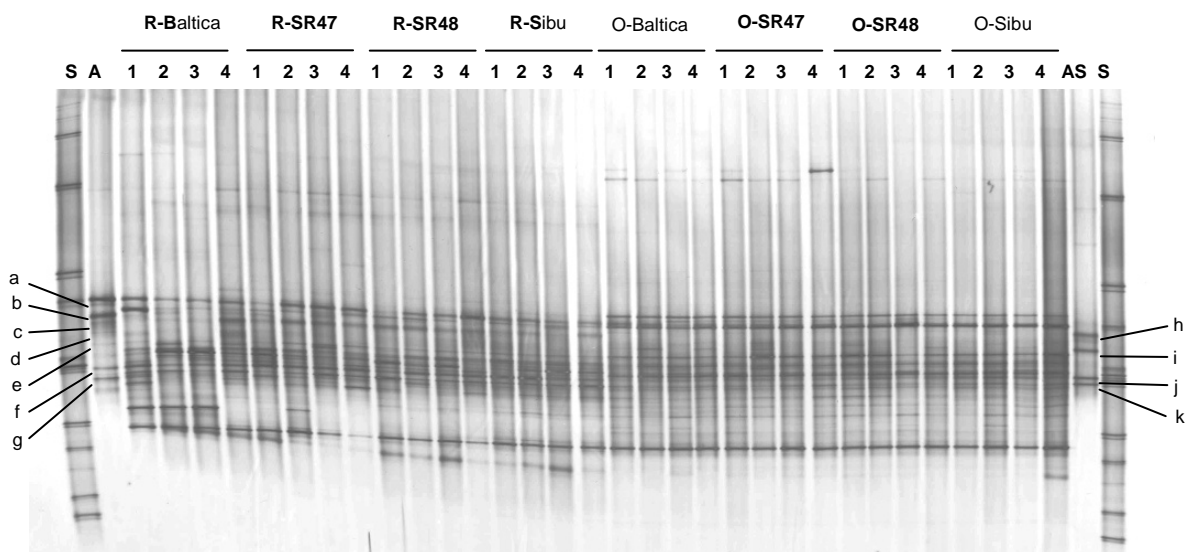


Abbildung 7b)

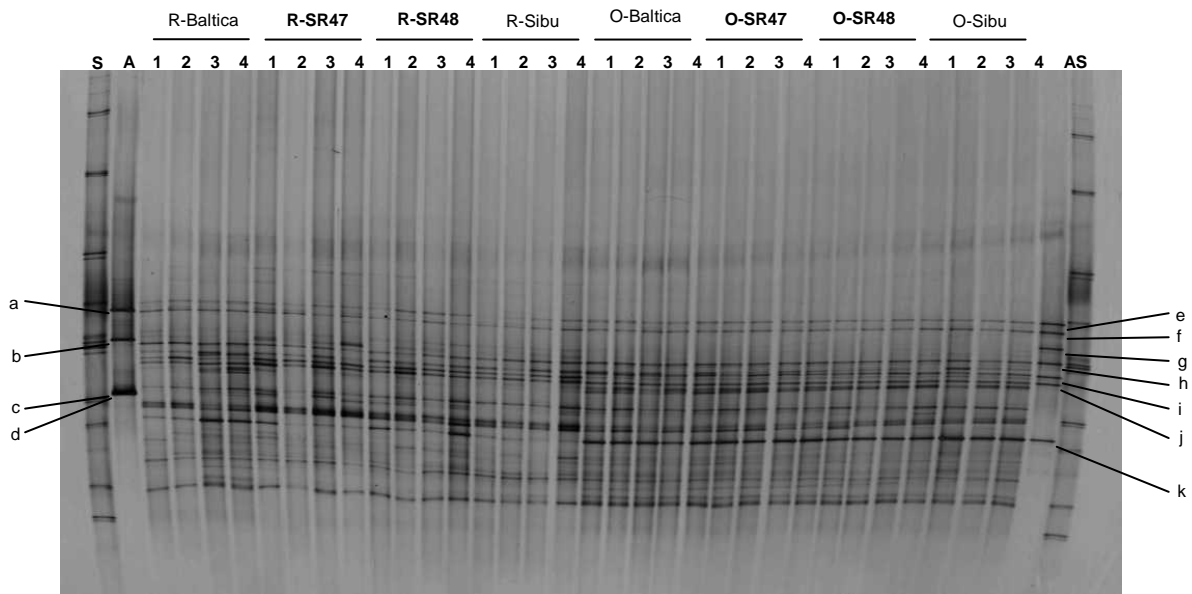


Abbildung 7c)

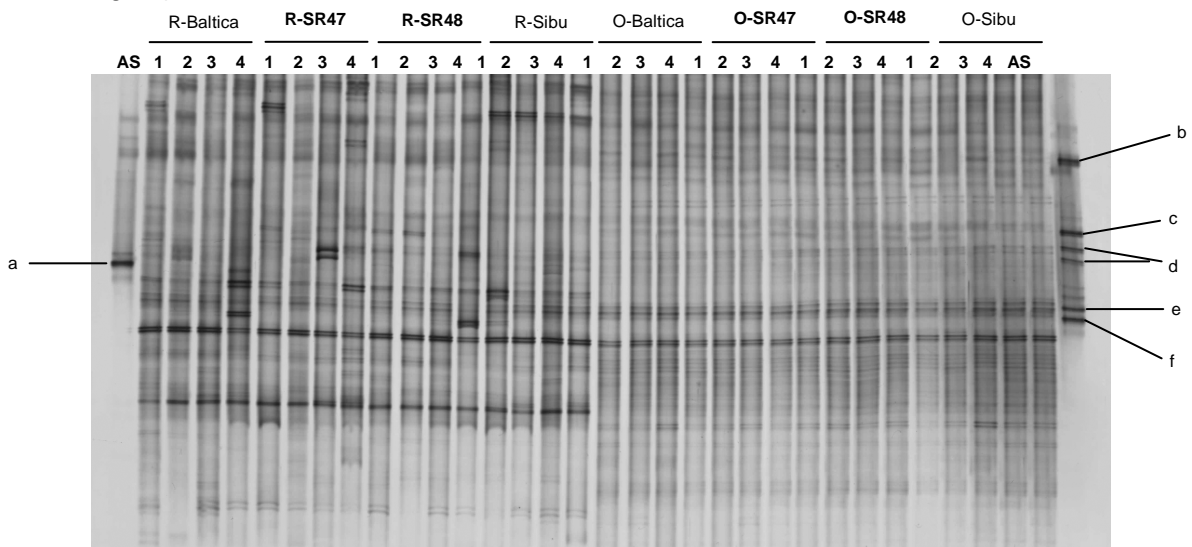


Abbildung 7: DGGE-Fingerabdrücke für *Pseudomonas* (a), *Streptomycetaceae* (b) und *Bacillus* (c) zum Zeitpunkt EC60 mit vier unabhängigen Wiederholungen der kommerziellen Sorten ‚Baltica‘ und ‚Sibu‘ und den beiden transgenen Linien SR47 und SR48 für die Standorte Roggenstein (2005) und Oberviehhäuser (2006).

S: Bakterienstandard, bestehend aus 11 Bakterienstämmen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität (Heuer et al. 1997). AS: Antagonistenstandard, bestehend aus den am häufigsten identifizierten *in vitro* Antagonisten gegen die Kartoffelpathogene *Rhizoctonia solani* AG-3, *Verticillium dahliae* V25 und *Phytophthora infestans* [Mont.] De Bary, die zuvor im Rahmen dieser Studie isoliert und durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens den Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Bacillus* zugeordnet werden konnten.

a) *Pseudomonas*-spezifischer Antagonistenstandard: a, b, d, f und g: *Pseudomonas fluorescens*, c: *P. putida*, e: *P. thivervalensis* für den Standort Roggenstein, h: *P. tolaasii*, i: *P. viridiflava*, j: *P. fluorescens*, k: *P. multiaromavorans* für den Standort Oberviehhäuser.

b) *Streptomycetaceae*-spezifischer Antagonistenstandard: a: *Streptomyces ciscaucasicus*, b: *S. scabiei*, c: *S. omiyaensis*, d: *S. phaeochromogenes* für den Standort Roggenstein, e und j: *S. bobili*, f und g: *S. ciscaucasicus*, h: *S. scabiei*, i: *S. mirabilis*, k: *S. flaveolus* für den Standort Oberviehhausen.

c) *Bacillus*-spezifischer Antagonistenstandard: a: *Paenibacillus polymyxa* für den Standort Roggenstein, b: *Brevibacillus laterosporus*, c: *Bacillus litoralis*, d: *B. megaterium* (Doppelbande), e: *B. pumilus*, f: *B. subtilis* für den Standort Oberviehhausen.

Verknüpfung von Struktur und Funktion bakterieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre

Die größte Zahl der *in vitro*-Antagonisten aus der Rhizosphäre beider Standorte konnte durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens den Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Bacillus* zugeordnet werden. Um den Effekt des Pflanzengenotyps und des Standortes auf das Vorkommen potentieller Antagonisten zu testen, wurden für jeden Standort Antagonistenstandards aus den am häufigsten isolierten Antagonisten dieser drei Genera hergestellt und mit den entsprechenden gruppenspezifischen Proben auf ein DGGE-Gel aufgetragen (Abbildung 7 a-c).

An beiden Standorten konnten jeweils für zwei Banden des *Pseudomonas*-Antagonistenstandards, die als *P. fluorescens* und *P. multiaromavorans* identifiziert wurden, Banden mit gleicher elektrophoretischer Mobilität im *Pseudomonas*-spezifischen „community“-Patterns zugeordnet werden (Abbildung 7a, Banden a, f und j, k).

Während für den Standort Roggenstein nur eine Bande des *Streptomyces*-Antagonistenstandards im entsprechenden „community“-Profil zu finden war (Abbildung 7b, Bande a), korrespondierten mehrere Banden des *Streptomyces*-Antagonistenstandards vom Standort Oberviehhausen mit Banden im *Streptomycetaceae*-„community“-Pattern (Abbildung 7b, Banden e, f und h-k).

Nur eine Bande des Antagonistenstandards vom Standort Oberviehhausen zeigte die gleiche elektrophoretische Mobilität wie eine Bande im entsprechenden *Bacillus*-„community“-Profil (Abbildung 7c, Bande e).

In keinem der Fälle zeigte sich ein Einfluss des Pflanzengenotyps auf das Vorhandensein von Banden potentieller Antagonisten. Jedoch muss hier angemerkt werden, dass für eine präzise Zuordnung potentieller Antagonisten im Profil eine Sequenzierung der entsprechenden Banden nötig gewesen wäre. Da die Möglichkeit besteht, dass unterschiedliche Bakterienspezies die gleiche elektrophoretische Mobilität in einem DGGE-Gel besitzen können, bleibt die bloße Zuordnung der Antagonisten „per Auge“ rein spekulativ. Trotzdem bietet die DGGE die Möglichkeit der Verknüpfung von Struktur und Funktion bakterieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit

wurden zur Veröffentlichung in „Applied and Environmental Microbiology“ akzeptiert und befinden sich im Druck:

Weinert, N., R. Meincke, C. Gottwald, H. Heuer, N.C. Gomes, M. Schloter, G. Berg, and K. Smalla. 2009. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. Appl. Environ. Microbiol. 75 (12)

2.1.3. Einfluss des Anbaus der transgenen Linien auf die strukturelle und funktionelle Diversität bakterieller Gemeinschaften in der Geocaulosphäre

Da die Zeaxanthin-Anreicherung der transgenen Kartoffellinien Knollen-spezifisch erfolgte, richtete sich ein weiterer Fokus der Arbeit auf die Untersuchung der strukturellen und funktionellen Diversität bakterieller Gemeinschaften in der Geocaulosphäre. Diese wurde erstmals von Lottmann et al. (1999) beschrieben und als der Bereich des Bodens definiert, der die Knollen umgibt und von diesen möglicherweise beeinflusst wird. Die Geocaulosphäre wurde am Standort Oberviehhausen (2006) und am Standort Roggenstein (2007) zum Zeitpunkt EC90 untersucht, als die Knollen vollständig ausgebildet waren. An beiden Standorten erfolgte zunächst die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (Tabelle 5). Für den Standort Oberviehhausen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen ‚Baltica‘ mit ‚Désirée‘, ‚Ditta‘ und ‚Sibu‘, sowie zwischen beiden transgenen Linien mit ‚Ditta‘ und ‚Sibu‘. Am Standort Roggenstein zeigten sich signifikant höhere CFU-Werte für ‚Baltica‘ und die beiden transgenen Linien gegenüber ‚Selma‘, für SR48 gegenüber ‚Désirée‘ und ‚Sibu‘ und für ‚Ditta‘ gegenüber ‚Selma‘.

Tabelle 5: Durchschnittswerte (\log_{10}) der Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units, CFU) pro g Geocaulosphäre-Frischmasse (GFM) für die Standorte Oberviehhausen (2006) und Roggenstein (2007) zum Probenahmezeitpunkt EC90. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$) nach dem T-Test.

Sorte/transgene Linie	Oberviehhausen 2006 Log ₁₀ (CFU x g ⁻¹ GFM)	Roggenstein 2007 Log ₁₀ (CFU x g ⁻¹ GFM)
‚Baltica‘	7,48 (a)	6,73 (ac)
SR47	7,49 (ab)	6,79 (ac)
SR48	7,48 (ab)	6,88 (c)
‚Selma‘	7,37 (ac)	6,1 (b)
‚Désirée‘	7,24 (bc)	6,41 (ab)
‚Ditta‘	7,1 (c)	6,71 (ac)
‚Sibu‘	7,31 (c)	6,57 (ab)

Proben vom Standort Oberviehhausen dienten der Untersuchung der funktionellen Diversität durch Bestimmung des antagonistischen Potentials gegen *Rhizoctonia solani* AG-3, *Verticillium dahliae* V25 und *Phytophthora infestans* [Mont.] De Bary. Dafür wurden von jeder Sorte bzw. jeder transgenen Linie jeweils 100 Bakterienkolonien gepickt und mittels Dualkulturtest auf ihr *in vitro* antagonistisches Potential getestet. Darüber hinaus wurde die Zusammensetzung der Gesamtbakteriengemeinschaft sowie der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Bacillus* mittels DGGE untersucht. Proben vom Standort Roggenstein wurden nur mit molekularen Fingerprints untersucht, wobei jedoch das Spektrum der untersuchten bakteriellen Gruppen erweitert wurde.

Die Anzahl der *in vitro*-Antagonisten unterschied sich in Abhängigkeit vom Pathogen und vom Kartoffelgenotyp. Die höchste Zahl an Antagonisten gegen alle drei Pathogene zeigte sich für die transgene Linie SR48 und die kommerzielle Sorte ‚Ditta‘ (Tabelle 6). Basierend auf dem Fisher-Test waren Unterschiede zwischen den Kartoffelgenotypen hoch signifikant (** $p \leq 0.01$) für Antagonisten gegen *R. solani* und *P. infestans* und signifikant (* $p \leq 0.05$) für Antagonisten gegen *V. dahliae*. Für genaue Aussagen über den Einfluss der gentechnischen Veränderung war die Anzahl der erhaltenen Antagonisten jedoch bei weitem zu gering.

Tabelle 6: Anzahl der *in vitro*-Antagonisten aus der Geocaulosphäre der sieben Kartoffelgenotypen gegen die Pathogene *Rhizoctonia solani* AG-3, *Verticillium dahliae* V25 und *Phytophthora infestans* [Mont.] De Bary

Sorte/ transgene Linie	<u>Anzahl getesteter Isolate</u>	<u>Anzahl der Antagonisten gegen</u>		
		<u><i>R. solani</i></u>	<u><i>V. dahliae</i></u>	<u><i>P. infestans</i></u>
‚Baltica‘	100	0	0	7
SR47	100	1	1	4
SR48	100	7**	5*	16**
‚Selma‘	100	1	1	9
‚Désirée‘	100	2	1	7
‚Ditta‘	100	6**	5*	22**
‚Sibu‘	100	1	1	4
Gesamtzahl	700	18	14	69

Basierend auf der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens konnte die Mehrzahl der *in vitro*-Antagonisten aus der Geocaulosphäre der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden (48.5%), gefolgt von den *Gammaproteobacteria* (22.1%) und *Actinobacteria* (20.6%) (Tabelle 7). Während bei Antagonisten, die der Gattung *Bacillus* zugeordnet wurden, vorrangig die Spezies *B. pumilus* identifiziert werden konnte, war die Diversität der Gattung *Streptomyces* mit zehn verschiedenen Spezies deutlich höher. Zwölf Isolate zeigten *in vitro* antagonistische Aktivität gegen alle drei Pathogene. Diese wurden als *Pseudomonas fluorescens* (n = 1), *Lysobacter gummosus* (n = 4), *Ensifer adhaerens* (n = 2) und *Dickeya chrysanthemi* (n = 5) identifiziert werden. Bei einem Vergleich der identifizierten *in vitro*-Antagonisten aus der Geocaulosphäre mit den Antagonisten aus der Rhizosphäre zum Zeitpunkt EC90 zeigte sich, dass die überwiegende Zahl der Spezies in beiden Mikrohabitaten vorkam. Einige der identifizierten Antagonisten wurden jedoch allein aus der Geocaulosphäre isoliert (markiert mit einem Stern in Tabelle 7).

Die Mehrzahl der *in vitro*-Antagonisten produzierte extrazelluläre Enzyme wie Glucanase (58 von 68), Cellulase (57 von 68) und Protease (46 von 68), während die Produktion von Chitinase (8 von 68), Siderophoren (15 von 68) und N-Acylhomoserin-Lactonen (10 von 68 in Gegenwart von *E. coli* pSB 403 und 5 von 68 in Gegenwart von *C. violaceum*) weniger häufig detektiert werden konnte.

Tabelle 7: Phylogenetische Zuordnung der *in vitro*-Antagonisten aus der Geocaulosphäre der sieben Kartoffelgenotypen

Phylum	Anzahl der Isolate
<i>Firmicutes</i>	n = 33 (48.5%)
<i>Bacillus pumilus</i>	27
<i>Bacillus subtilis</i>	5
<i>Bacillus licheniformis</i> *	1
<i>Gammaproteobacteria</i>	n = 15 (22.1%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
<i>Lysobacter enzymogenes</i> *	3
<i>Lysobacter gummosus</i>	5
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	5
High G+C Gram-positives	n = 14 (20.6%)
<i>Streptomyces acidiscabies</i>	1
<i>Streptomyces antibioticus</i> *	1
<i>Streptomyces bobili</i>	2
<i>Streptomyces chartreusis</i> *	1
<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> *	1
<i>Streptomyces flaveolus</i>	1
<i>Streptomyces flavolimosus</i>	3
<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	1
<i>Streptomyces puniceus</i>	1
<i>Streptomyces tubercidicus</i>	1
<i>Tsukamurella pulmonis</i> *	1
CFB group bacteria	n = 3 (4.4%)
<i>Flavobacterium</i> sp.*	1
<i>Flavobacterium pectinovorum</i> *	1
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> *	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	n = 2 (2.9%)
<i>Ensifer adhaerens</i> *	2
<i>Betaproteobacteria</i>	n = 1 (1.5%)
<i>Zoogloea ramigera</i> *	1
Gesamtzahl der identifizierten Isolate	68

Für die Untersuchung der strukturellen Diversität der bakteriellen Gemeinschaften in der Geocaulosphäre wurden die generierten DGGE-Fingerabdrücke wie bereits oben beschrieben zum einen auf signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Linien und der Ausgangssorte ‚Baltica‘ und zum anderen auf signifikante Unterschiede zwischen allen sieben Kartoffelgenotypen getestet.

Für den Standort Oberviehhausen zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen ‚Baltica‘ und den transgenen Linien noch zwischen allen sieben Genotypen (Tabelle 8). Die 16S-basierte Analyse der bakteriellen Geocaulosphäre-Gemeinschaften am Standort Roggenstein (2007) schloss weitere bakterielle Gruppen, sowie das *Pseudomonas*-spezifische *gacA*-Gen ein. Während für den Vergleich von ‚Baltica‘ mit den transgenen Linien

auch hier keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten, wurden diese jedoch beim Vergleich der *Pseudomonas*-Fingerprints aller sieben Kartoffelgenotypen detektiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Prozentuale Unterschiede zwischen bakteriellen DGGE-Fingerabdrücken aus Proben der Geocaulosphäre für den Vergleich von 'Baltica' mit den transgenen Linien und den Vergleich aller Kartoffelgenotypen

DGGE Gel	Pflanzen- stadium	Oberviehhausen 2006		Roggenstein 2007	
		Vergleich von Baltica-GM Linien	Vergleich von aller Genotypen	Vergleich von Baltica-GM Linien	Vergleich von aller Genotypen
<i>Bacteria</i>	EC90	0.0	0.3	0.0	1.6
<i>Pseudomonas</i>	EC90	0.0	0.0	1.2	3.4
<i>Actinobacteria</i>	EC90	-	-	0.0	0.0
<i>Alphaproteobacteria</i>	EC90	-	-	0.4	0.6
<i>Betaproteobacteria</i>	EC90	-	-	0.0	0.7
<i>Bacillus</i>	EC90	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Streptomycetaceae</i>	EC90	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>gacA</i>	EC90	-	-	0.0	0.6

Im Vergleich zum Effekt des Kartoffelgenotyps auf die bakteriellen Gemeinschaften in der Geocaulosphäre zeigten sich deutlich stärkere Effekte durch den Einfluss des Standortes. So unterschieden sich die Fingerprints der Gesamtbakteriengemeinschaften beider Standorte um 27%. Ebenso konnten signifikante Standortunterschiede für *Streptomycetaceae*-Fingerprints detektiert werden, die sich um 34% unterschieden (Abbildung 8).

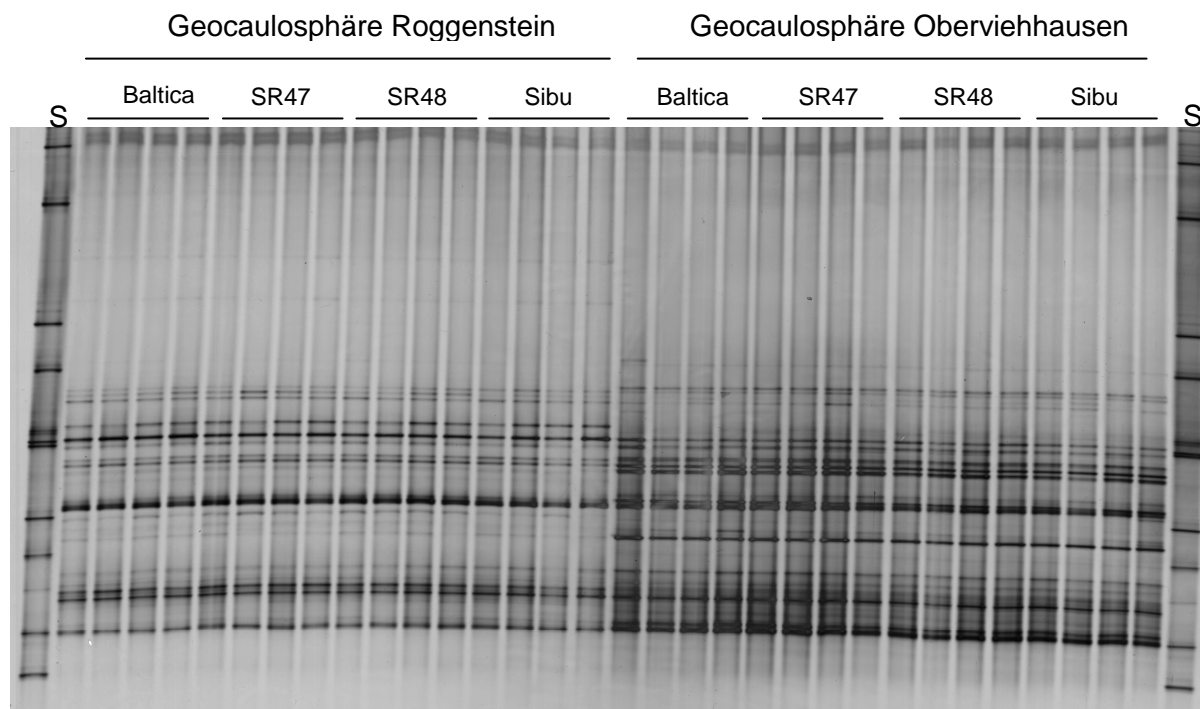


Abbildung 8: *Streptomycetaceae*-spezifische DGGE-Fingerabdrücke der Geocaulosphäre zum Zeitpunkt EC90 für vier unabhängige Wiederholungen der kommerziellen Sorten ‚Baltica‘ und ‚Sibu‘ und der beiden transgenen Linien SR47 und SR48 am Standort Roggenstein (2007) und am Standort Oberviehhausen (2006). S: Bakterienstandard aus 11 Bakterienstämmen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität.

Neben dem signifikanten Effekt des Standortes auf die bakteriellen Gemeinschaften in der Geocaulosphäre zeigten sich auch für den Vergleich der Fingerprints der Mikrohabitate (Rhizosphäre und Geocaulosphäre) signifikante Unterschiede für die Gesamtbakterien sowie für die *Streptomycetaceae*-, *Bacillus*- und *Pseudomonas*-Fingerprints. Während sich die Fingerprints der Mikrohabitate für die *Streptomycetaceae* mit 43% am deutlichsten unterschieden (Abbildung 9), lagen die Unterschiede für *Bacillus* (Abbildung 10) und *Pseudomonas* mit 14% bzw. 12.5% deutlich niedriger. Dennoch hatten Umweltfaktoren wie Standort und Mikrohabitat einen bedeutend größeren Effekt auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften in der Geocaulosphäre als Effekte durch den Kartoffelgenotyp bzw. die genetische Veränderung der Pflanzen.

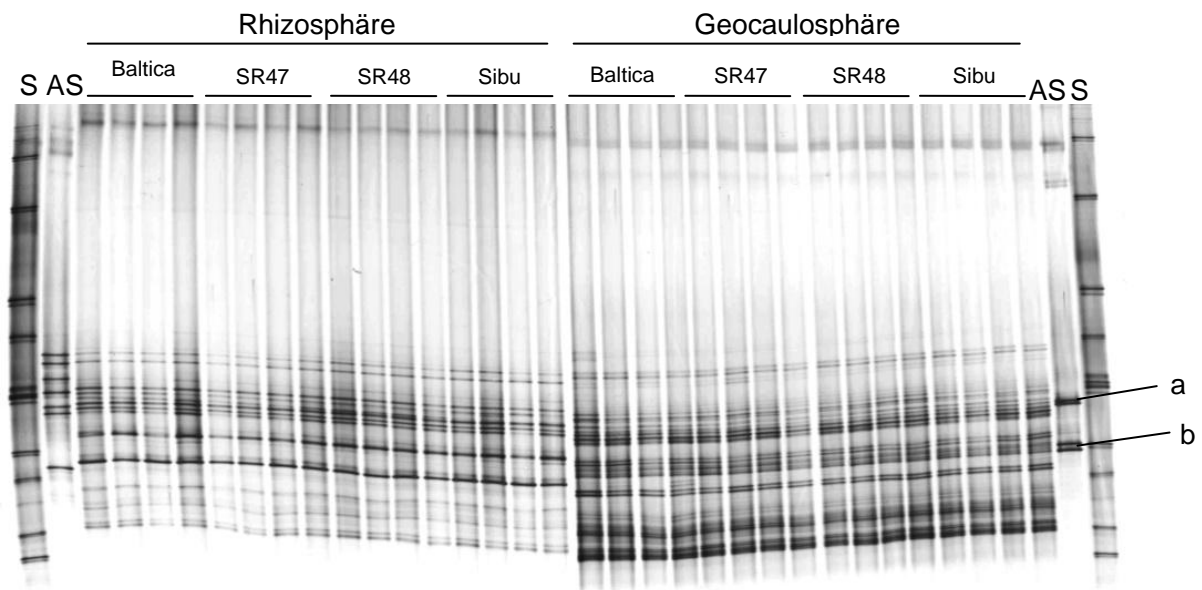


Abbildung 9: *Streptomycetaceae*-spezifische DGGE-Fingerabdrücke der Rhizosphäre und Geocaulosphäre zum Zeitpunkt EC90 für vier unabhängige Wiederholungen der kommerziellen Sorten ‚Baltica‘ und ‚Sibü‘ und der beiden transgenen Linien SR47 und SR48 am Standort Oberviehhausen (2006). S: Bakterienstandard aus 11 Bakterienstämmen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität. AS: *Streptomycetaceae* Antagonistenstandard aus Isolaten der Geocaulosphäre, a: *Streptomyces bobili*, b: *S. flavolimosus*.

Verknüpfung von Struktur und Funktion bakterieller Gemeinschaften in der Geocaulosphäre

Wie zuvor für *in vitro*-Antagonisten aus der Rhizosphäre wurden auch für die am häufigsten identifizierten Antagonisten aus der Geocaulosphäre Antagonistenstandards hergestellt und zusammen mit den entsprechenden gruppenspezifischen Amplikons auf ein DGGE-Gel aufgetragen. Der Antagonistenstandard für die Gattung *Bacillus* bestand aus zwei *B. pumilus*-Isolaten und einem *B. subtilis*-Isolat. Beide Banden der *B. pumilus*-Isolate hatten die gleiche elektrophoretische Mobilität zu einer dominanten Bande im *Bacillus*-Profil (Abbildung 10, Bande b). Der Antagonistenstandard der *Streptomycetaceae* setzte sich aus zwei Spezies zusammen, *Streptomyces bobili* und *S. flavolimosus*, die beide eine Doppelbande im DGGE-Gel zeigten. Die obere Bande von *S. bobili* und beide Banden von *S. flavolimosus* hatten die gleiche elektrophoretische Mobilität zu dominanten Banden im *Streptomycetaceae*-Profil (Abbildung 9, Banden a und b).

Die Ergebnisse dieses Teils des Projekts liegen als Manuskript vor und werden zur Publikation in „FEMS Microbiology Ecology“ eingereicht:

Weinert N., R. Meincke, C. Gottwald, H. Heuer, M. Schloter, G. Berg, and K. Smalla.
 Microbial life in the geocaulosphere: influence of plant genotype and site.

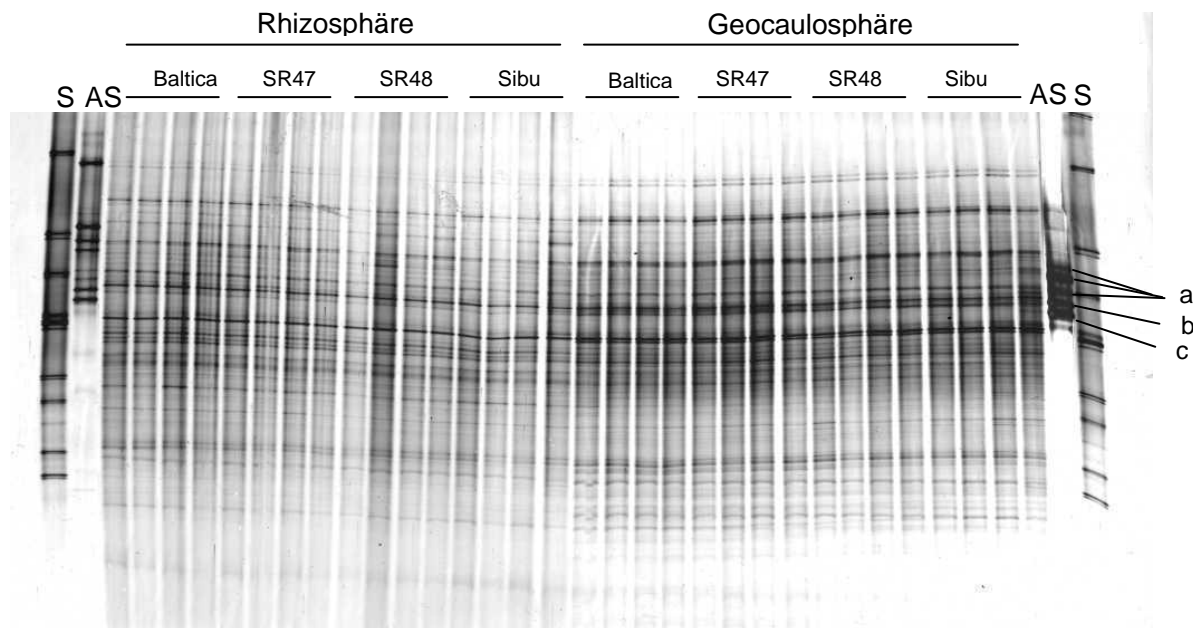


Abbildung 10: *Bacillus*-spezifische DGGE-Fingerabdrücke der Rhizosphäre und Geocaulosphäre zum Zeitpunkt EC90 für vier unabhängige Wiederholungen der kommerziellen Sorten ‚Baltica‘ und ‚Sibü‘ und der beiden transgenen Linien SR47 und SR48 am Standort Oberviehhausen (2006). S: Bakterienstandard aus 11 Bakterienstämmen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität. AS: *Bacillus* Antagonistenstandard aus Isolaten der Geocaulosphäre, a und b: *B. pumilus*, c: *B. subtilis*.

2.1.4. Untersuchungen zum Einfluss der Sorte und des Standortes auf bakterielle Gemeinschaften in der Rhizosphäre

Ein weiterer Teil der Arbeit umfasste Untersuchungen zum Einfluss der Sorte und des Standortes auf die **taxonomische** Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphäre-Gemeinschaften. Dafür wurde die Gesamt-DNA aus der Rhizosphäre der kommerziellen Sorten ‚Baltica‘, ‚Désirée‘ und ‚Sibü‘ an beiden Standorten im Jahr 2006 zum Pflanzenstadium EC60 mit PhyloChips und 16S rRNA Klonbibliotheken untersucht. Für beide Untersuchungsmethoden wurden die 16S rRNA-Genfragmente aus der Gesamt-DNA amplifiziert. Die Untersuchungen mit PhyloChips wurden in der Arbeitsgruppe von Gary Andersen, Lawrence Berkeley Laboratory, Berkeley (USA) durch Y. Piceno durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden fragmentiert und mit Biotin markiert. Der PhyloChip ermöglicht die

Detektion von mehr als 8.700 „operational taxonomic units“. Die PhyloChips erlaubten die Identifizierung von 2.362 operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) in der Rhizosphäre und zeigten sowohl einen signifikanten Effekt des Standortes ($p \leq 0.001$) als auch der Sorte ($p = 0.014$) auf die bakteriellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre (Abbildung 11).

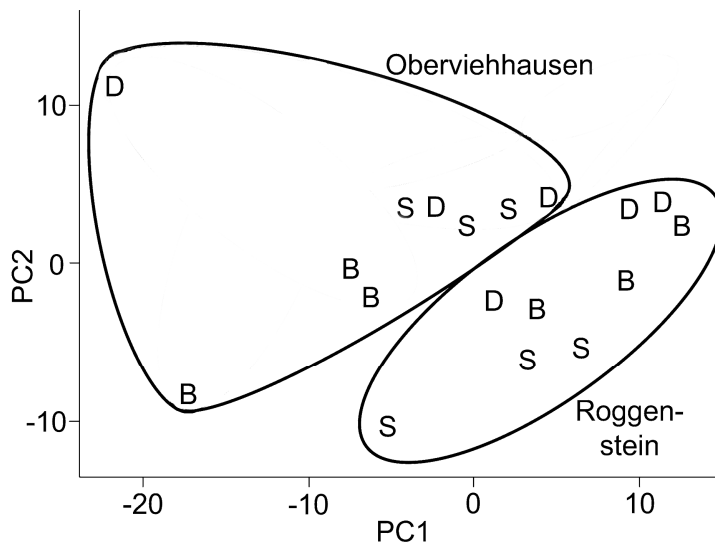


Abbildung 11: Principal component analysis (PCA) von PhyloChip-Daten der Kartoffelrhizosphäre der Sorten ‚Baltica‘, ‚Désirée‘ und ‚Sibu‘ an den Standorten Roggenstein und Oberviehhausen.

Die weitere Analyse der PhyloChips zeigte, dass der signifikante Standorteffekt vorrangig auf Mitglieder der *Alphaproteobacteria* zurückzuführen war (Abbildung 12), während der signifikante Sorteneffekt vor allem auf Unterschiede in der Abundanz von OTU der *Enterobacteriaceae* zurückzuführen war (Abbildung 13).

Site Differentiating Taxa	No. of OTU
<i>Rhizobiales</i>	19
<i>Sphingomonadaceae</i>	18
<i>Burkholderiales</i>	11
<i>Actinobacteria</i>	8
<i>Xanthomonadaceae</i>	6
<i>Sphingobacteria</i>	5
TM7	4
<i>Acidobacteria</i>	3
<i>Caulobacteraceae</i>	3
<i>Firmicutes</i>	3
<i>Rhodocyclaceae</i>	3
<i>Verrucomicrobia</i>	3
<i>Flavobacteriaceae</i>	2
<i>Geobacteraceae</i>	2
Mnd1 Clone Group	2
<i>Alteromonadaceae</i>	1
<i>Halomonadaceae</i>	1
<i>Oceanospirillaceae</i>	1
Od1	1
<i>Piscirickettsiaceae</i>	1
<i>Rhodobacteraceae</i>	1
<i>Rickettsiaceae</i>	1
<i>Thermotogaceae</i>	1

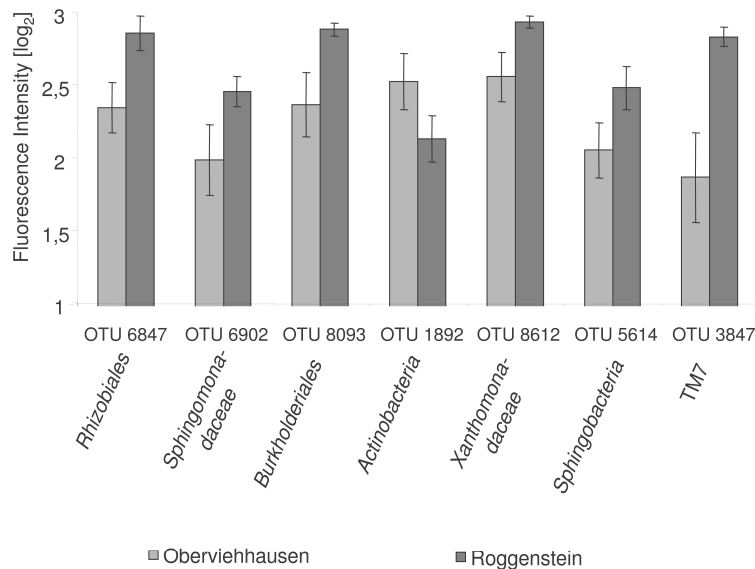


Abbildung 12: Phylogenetische Zuordnung der mittels PhyloChip identifizierten Taxa, die zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Standorten Roggenstein und Oberviehhausen beitragen (links), und Vergleich der detektierten Anzahl von OTUs der ersten sieben Taxa zwischen beiden Standorten (rechts).

Cultivar differentiating taxa	No. of OTU
<i>Enterobacteriaceae</i>	28
<i>Pseudomonadaceae</i>	6
<i>Shewanellaceae</i>	6
<i>Alteromonadaceae</i>	2
<i>Aeromonadaceae</i>	1
<i>Comamonadaceae</i>	1
<i>Cyanobacteria</i>	1
<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	1
<i>Rhodobacteraceae</i>	1
<i>Streptomycetaceae</i>	1
TM7	1
<i>Xanthomonadaceae</i>	1

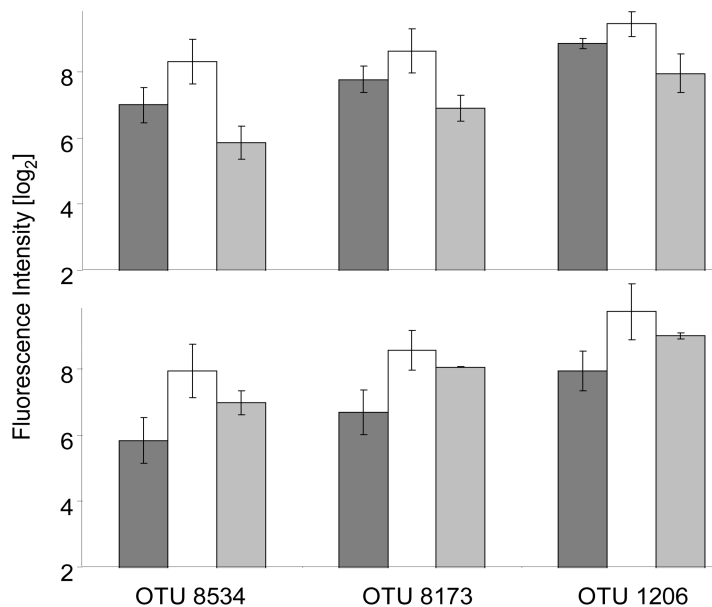


Abbildung 13: Phylogenetische Zuordnung der mittels PhyloChip identifizierten Taxa, die zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Sorten beitragen (links), und Vergleich der Abundanz dreier ausgewählter *Enterobacteriaceae* OTUs für die drei Sorten (rechts). Dunkelgrau: ‚Baltica‘, weiß: ‚Désirée‘, hellgrau: ‚Sibü‘.

Aus der gleichen „community“ DNA wurden 16S rRNA-Genfragmente aus vier Wiederholungen pro Sorte und Standort amplifiziert und ein Aliquot der gepoolten Amplikons für die Klonierung verwendet. Für jede Sorte wurde pro Standort eine 16S Klonbibliothek generiert. Pro Klonbibliothek wurden ca. 100 Klone gepickt und durch Sequenzierung analysiert.

Mit beiden Methoden konnten die gleichen Taxa in der Rhizosphäre detektiert werden. Darüber hinaus zeigte sich bei beiden Methoden, dass die *Alphaproteobacteria* das abundanteste Taxon in der Rhizosphäre aller Sorten ausmachten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Prozentuale Anteile der Klone aus 16S rRNA-Klonbibliotheken von Rhizosphärenproben der Kartoffelsorten ‚Baltica‘ (Bal), ‚Désirée‘ (Dés) und ‚Sibu‘ (Sib) an den Standorten Roggenstein (R) und Oberviehhausen (O) an den detektierten bakteriellen Taxa und der entsprechende Anteil der 100 häufigsten operativen taxonomischen Einheiten auf dem PhyloChip.

	R-Bal	R-Dés	R-Sib	O-Bal	O-Dés	O-Sib	Phylochip
<i>Alphaproteobacteria</i>	36%	42%	29%	29%	30%	18%	24%
<i>Betaproteobacteria</i>	13%	19%	21%	7%	14%	15%	12%
<i>Acidobacteria</i>	11%	11%	8%	11%	18%	9%	7%
<i>Gammaproteobacteria</i>	7%	7%	12%	6%	10%	12%	7%
<i>Actinobacteria</i>	5%	3%	9%	7%	7%	5%	3%
<i>Firmicutes</i>	5%	8%	2%	13%	7%	12%	9%
<i>Verrucomicrobia</i>	5%	3%	2%	1%	2%	5%	4%
<i>Bacteroidetes</i>	4%	4%	8%	8%	1%	9%	15%

Die Ergebnisse dieses Teils des Projekts liegen als Manuskript vor, das nach Zustimmung der Koautoren zur Publikation bei „The ISME Journal“ eingereicht wird: **Weinert, N., Y. Piceno, R. Meincke, H. Heuer, G. Berg, M. Schloter, G. Andersen and K. Smalla.** Bacterial diversity in the rhizosphere of potato plants: site and cultivar effects revealed by phylochip analysis.

Zusammenfassend konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass Effekte auf bakterielle Gemeinschaften in der Rhizosphäre und Geocaulosphäre durch die transgenen Pflanzen detektiert werden konnten, der Einfluss verschiedener Kartoffelgenotypen jedoch in allen Fällen einen größeren Effekt hatte als die gentechnische Veränderung der Pflanzen. Dem gegenüber hatten Umweltfaktoren wie Standort, Jahr oder Pflanzenentwicklungsstadium den größten Effekt auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften und ihr antagonistisches Potential.

2.2. Ergebnisse Pilze

Innerhalb des Projekts konnten die folgenden beiden Fragestellungen mit Hilfe einer Kombination aus kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Methoden beantwortet werden:

- **Welchen Einfluss hat die transgene Veränderung auf die strukturelle Diversität der Pilze in der Rhizosphäre und Endorhiza?**

Mikropilze erwiesen sich als herausragende Indikatororganismen für die Bewertung von Einflüssen auf die mikrobielle Gemeinschaft. Bei einem Vergleich von unterschiedlichen kommerziellen Sorten mit den transgenen Varianten, unterschiedlichen Entwicklungsstadien in unterschiedlichen Böden stellte sich allerdings heraus, dass der Standort den größten Einfluss auf die strukturelle Diversität der Pilzgemeinschaft hat. Die Untersuchungen wurden mit Fingerprints der Pilzgemeinschaften (DGGE mit Pilz- und Ascomyceten-spezifischen Primern) durchgeführt und in Weinert et al. (2009) veröffentlicht.

- **Welchen Einfluss hat die transgene Veränderung auf das antagonistische Potenzial der Pilzgemeinschaft, insbesondere auf die Indikatorgruppe *Trichoderma*?**

Für die Untersuchungen der *Trichoderma*-Gemeinschaft wurden verschiedene Techniken genutzt, die zum einen auf Kultivierung und zum anderen auf der isolierten DNA beruhen. Letztere wurde für die Bestimmung der Abundanz von *Trichoderma* mittels qPCR (Hagn et al. 2007) und für mikrobielle Fingerprints und eine Genbibliothek von beiden Standorten (Roggenstein, Oberviehhausen) benutzt. Um eine sichere Identifizierung der Stämme und Klone zu gewährleisten, wurde ein neuer *Trichoderma*-Primer genutzt, dessen Entwicklung im nächsten Abschnitt kurz beschrieben wird. Eine ausführliche Beschreibung wird in der Publikation von Meincke et al. (2009) veröffentlicht.

Entwicklung eines Trichoderma-spezifischen Primers

Der *Trichoderma*-spezifische Primer wurde *in silico* gegen in Datenbanken befindliche Sequenzen: ISTH Datenbank (123 Isolate) und NCBI Datenbank (577 Isolate) abgeglichen. Für das Screening potenzieller DNA-Regionen wurden die Sequenzen einem Vergleich mit der ARB-Datenbank (Ludwig et al. 2004) und BLAST unterzogen. Basierend auf den Ergebnissen wurde ein Primerpaar mit einem mittleren GC-Gehalt und einer Schmelztemperatur zwischen $> 50\text{ °C} < 60\text{ °C}$ und einer Größe von $> 300\text{ bp}$ ausgewählt, das gleichzeitig eine Identifizierung mit TrichoKey 2.0 und TrichoBlast erlaubt. Die Primer haben

die folgenden Sequenzen: ITS1Trf (5'-ACTCCCAAACCCAATGTGAA-3', Tm: 53.9 °C) und ITS4TrR (5'- TGTGCAAACACTACTGCGCA-3', Tm: 54.6 °C). Dieser Primer passt zu den o. g. Sequenzen in 378 Fällen 100 %ig, insbesondere zur Gruppe I „Harzianum“ und zur Gruppe XII „Viride“ Clade gehörend. Die übrigen 139 Sequenzen, welche alle anderen *Trichoderma*-Gruppen präsentieren, passen zu 90 %; nur 15 Sequenzen zeigen keine Übereinstimmung. Weiterhin wurde der Primer an Isolaten überprüft, die aus Arbeiten von Grosch et al. (2007) und Hagn et al. (2007) sowie aus dieser Studie stammen. Als Negativkontrollen diente DNA von *Phytophthora infestans* und *Verticillium dahliae* ELV 25. Alle *Trichoderma*-Isolate zeigten ein positives Signal (Fragment ca. 450 bp) während die Negativkontrollen kein Signal ergaben. Eine Annealing-Temperatur von 53 °C wurde kalkuliert und mittels Temperaturgradienten-PCR verifiziert.

Abundanz von Trichoderma in der Rhizosphäre der analysierten Kartoffelsorten

Die Abundanzen wurden mittels qPCR, die spezifisch für die Gattung *Trichoderma* ist, ermittelt (Hagn et al., 2007). Statistisch signifikante Unterschiede (χ^2 -test) wurden ausschließlich für die beiden Standorte Oberviehhausen 849.90 (± 189.8) Kopien ml⁻¹ und in Roggenstein 297.81 (± 66.7) ermittelt. In den Vergleich wurden alle Sorten - ‚Baltica‘, ‚Désirée‘, ‚Ditta‘ und ‚Sibu‘ wie auch die transgenen Linien - einbezogen. Die höchsten Werte wurden für Oberviehhausen in den Proben der Sorte ‚Ditta‘ mit bis zu 3988.63 Kopien pro μ l ermittelt. In Roggenstein, wo die Werte generell niedriger waren, wurde die höchste Kopienzahl für die Sorte ‚Baltica‘ mit 683.6 Kopien pro μ l ermittelt. Obwohl die Sorten ‚Ditta‘ und ‚Baltica‘ tendenziell höhere Werte ergaben, ließ sich mittels statistischer Analyse (ANOVA II) kein signifikanter Unterschied ermitteln. Dies lässt sich wahrscheinlich mit der großen Heterogenität in den unterschiedlichen Parzellen der einzelnen Sorten begründen. Ebenfalls zwischen den unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten, die mit den verschiedenen Entwicklungsstadien der Kartoffelpflanze korrelieren, gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Diversität von Trichoderma-Klonen in der Rhizosphäre der analysierten Kartoffelsorten

Von allen Sorten und Standorten wurden zu unterschiedlichen Probenahmezeiten insgesamt 174 Klone isoliert (91 von Oberviehhausen, 83 von Roggenstein). Diese Klone wurden anhand ihrer ITS-Sequenz mit TrichoKey 2.0 und TrichoBLAST identifiziert. Die Ergebnisse

sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Mehrzahl der Sequenzen wurde als *Hypocrea* (Teleomorphe) oder *Trichoderma* (dazugehörige Anamorphe) mit einer Ähnlichkeit von 95%-100% bestimmt. Der größte Anteil der Klone wurde als *Trichoderma stromaticum* und *Trichoderma viride* identifiziert. Eine Gruppe wurde ausschließlich in Oberviehhausen gefunden und als *Trichoderma brevicompactum* bestimmt. Sequenzen der *Trichoderma*-Gruppe Clade I wurden weniger in Oberviehhausen als in Roggenstein gefunden. Überraschend wurden Sequenzen von *Trichoderma harzianum*, der kosmopolitisch und ubiquitär verbreitet ist, nur selten gefunden. Insgesamt konnten 20 unterschiedliche *Trichoderma*-Arten identifiziert werden. Die Anzahl der Arten war höher für Oberviehhausen (17) als für Roggenstein (11), was die unterschiedlichen *Trichoderma*-Populationen der beiden Standorte bestätigte. Abbildung 1 zeigt die Zuordnung der Klone zu den phylogenetisch unterschiedlichen *Trichoderma*-Gruppen zeigt.

Out-group
 Clade I
 Clade VIII
 Clade IX

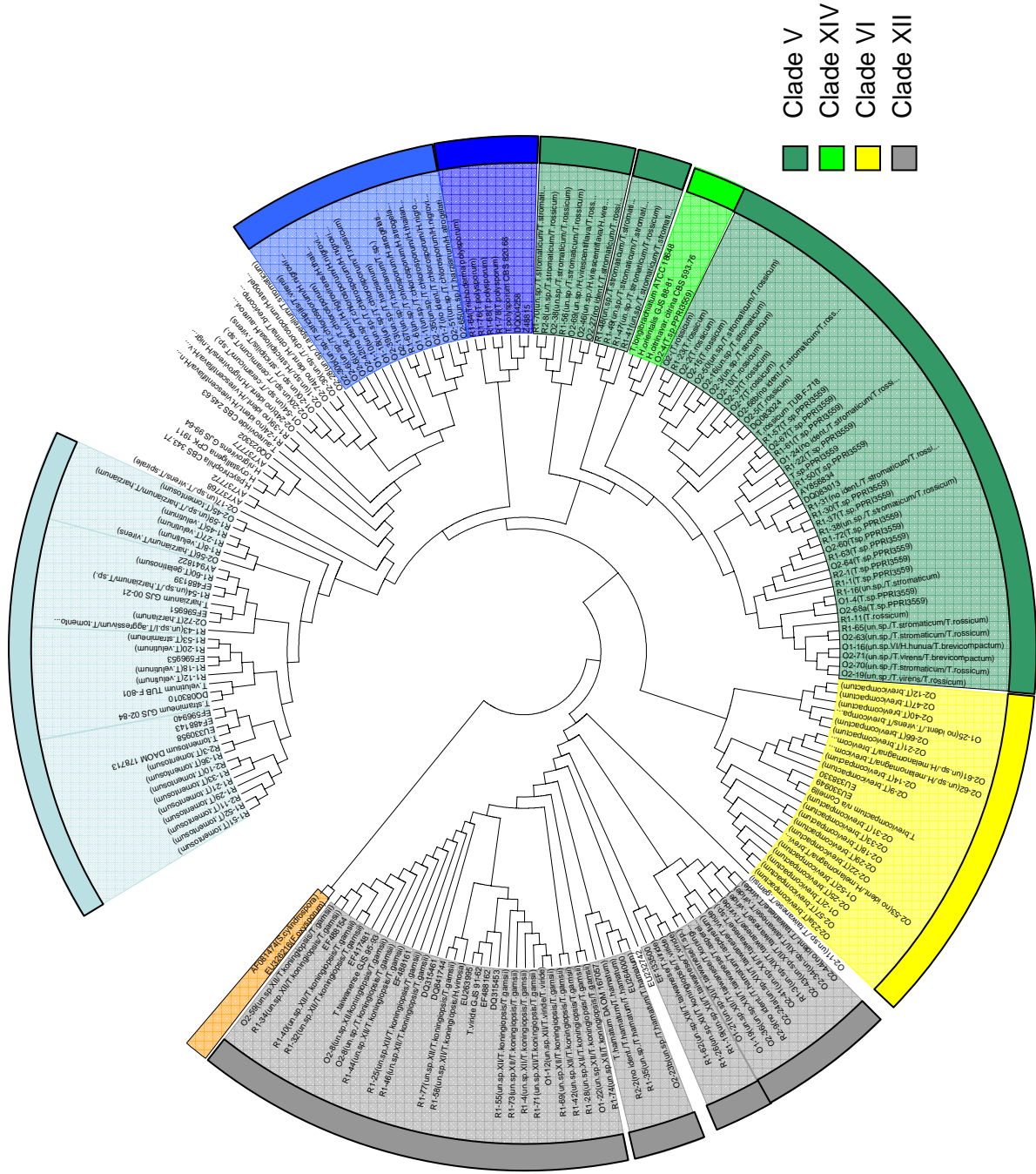


Abbildung: Phylogenetische Aufteilung der identifizierten *Trichoderma*-Klone

Diversität von Trichoderma-Gemeinschaften in der Rhizosphäre der analysierten Kartoffelsorten

Um die Struktur der *Trichoderma*-Gemeinschaft zu studieren und zu vergleichen, wurden alle Proben mittels ITS-PCR DGGE untersucht, wobei der neu entwickelte Primer zum Einsatz kam. Für alle Proben wurden zwischen 10 und 35 Banden ermittelt. In der Abbildung 3 sind die Fingerprints der *Trichoderma*-Populationen der 3. Probenahme Oberviehausen exemplarisch gezeigt. Dargestellt ist der Vergleich der Sorten Baltica und Selma mit den beiden transgenen Linien. Obgleich einige Banden für alle Sorten gleich sind, zeigen die Proben eine hohe Diversität. Wiederum konnten nur Standort-spezifische Unterschiede, jedoch keine Unterschiede zwischen den Sorten und den Probenahmen gezeigt werden.

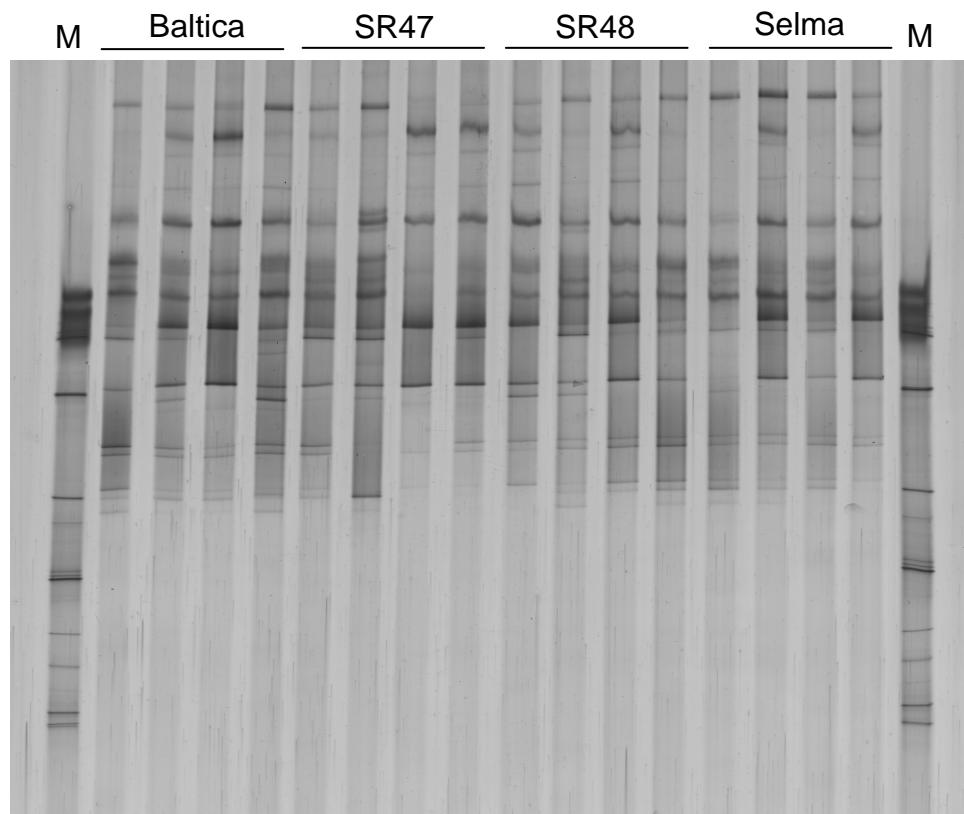


Abbildung: DGGE Fingerprints der *Trichoderma*-Gemeinschaft vom Pflanzenstadium EC90 jeweils in 4 unabhängigen Wiederholungen der Sorte 'Baltica' und 'Selma' sowie der zwei transgenen Linien SR47 und SR48 von Oberviehausen (2006). M: Standard (Heuer et al., 1997).

Schlussfolgerungen

Die Gattung *Trichoderma* gilt als Indikator für Pilze. In den vorliegenden Untersuchungsergebnissen wurde ein umfassendes Arsenal an Methoden genutzt, um die *Trichoderma*-Populationen zu charakterisieren und zu vergleichen. Neue Werkzeuge wurden entwickelt und kamen zum hierbei zum Einsatz. Mittels all dieser Methoden konnten große Unterschieden zwischen den beiden Standorten ermittelt werden. In Oberviehhausen, war die Gattung *Trichoderma* stark abundant und in hoher Diversität vertreten. Im Gegensatz, in Roggenstein waren 3-fach niedrigere Abundanzen korrelierend mit einer geringen Artenzahl kennzeichnend. Die Unterschiede zwischen den Sorten waren geringfügig und nicht statistisch signifikant. Dasselbe traf für die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kartoffel zu.

2. Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

An den durchgeführten Projektarbeiten waren folgende Gruppen beteiligt, die entsprechende Zuwendungen des BMBF erhielten (die durch das BMBF finanzierten Personen sind kursiv dargestellt):

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (seit 1.1.2008 Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen)

Nicole Weinert (Doktorandin), *Christine Gottwald* (technische Assistentin)

Gerrit Czeplie (Diplomand)

Alexander Büttner (Praktikant)

Ellen Krögerrecklenfort (Technische Assistentin)

Ute Zimmerling (Technische Assistentin)

Ilse-Marie Jungkurth (Sekretärin)

Professor Dr. Kornelia Smalla (Projektleiterin)

Unterauftrag

Technische Universität Graz

Institut für Umweltbiotechnologie

Remo Meincke (Doktorand)

Professor Dr. Gabriele Berg (Projektleiterin)

Otto von Guericke-Universität Magdeburg

PD Dr. Siegfried Kropf

3. Notwendigkeit der Arbeiten:

Zur Bewertung des Effekts transgener Zeaxanthin-Kartoffeln auf die mikrobielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre und der Geocaulosphäre war eine experimentelle Erhebung der genannten Parameter im durchgeführten Umfang nötig. Die Daten zeigen, dass Effekte transgener Pflanzen mit dem gewählten multifaktoriellen Ansatz detektiert werden können und dass ein Zusammenhang zwischen Pflanzenphänotyp/-genotyp, Pflanzenentwicklungsstadium, Jahr und Standort besteht.

Fast alle im Projektantrag geplanten Meilensteine wurden bearbeitet.

Die entsprechenden Ergebnisse sind unter II 1. (Bakterien) und II 2. (Pilze) dargestellt.

Folgende ursprünglich geplante Arbeiten führten zu keinen bewertbaren Ergebnissen:

- Die Untersuchung der Endorrhiza wurde aufgrund experimenteller Probleme mit der Oberflächensterilisation, aber auch aus Kapazitätsgründen nicht durchgeführt.

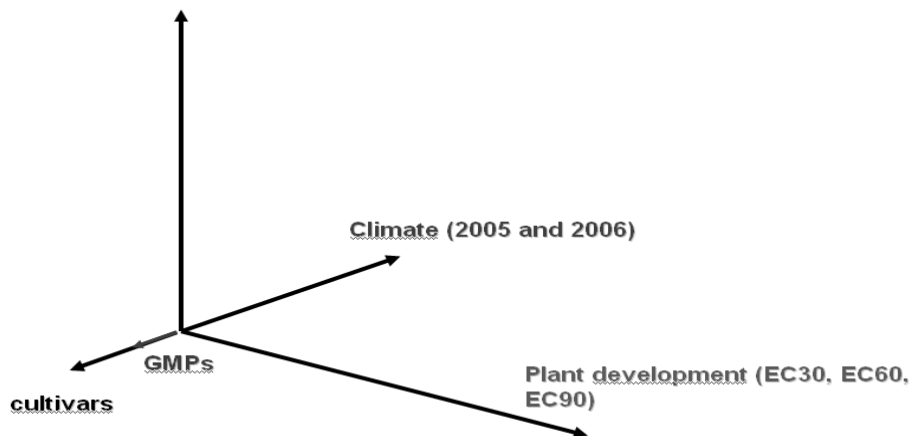
- Ebenfalls aus Kapazitätsgründen wurden im Projektjahr 2005 keine Geocaulosphäre-Proben untersucht.
- Die Nutzung der „functional arrays“ zeigte eine zu hohe Variabilität zwischen den Wiederholungen, so dass sie zwar interessante Informationen über das Vorhandensein funktioneller Gene lieferten, nicht aber für die Beantwortung der im Projekt zu beantwortenden Fragestellungen geeignet waren.
- Dafür wurden zusätzlich Informationen zur taxonomischen Zusammensetzung der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaft mit Hilfe von PhyloChip-Analysen erhalten.

4. Nutzen (aus dem Bericht vom Verbundkoordinator in modifizierter Form übernommen):

Aus den gewonnenen Daten konnte folgendes Bewertungsschema abgeleitet werden. Den deutlich größten Einfluss auf die untersuchten Parameter der Bodenqualität hatten der Standort und das damit verbundene Management (Pestizideinsatz, Düngerapplikation). Die unterschiedliche Witterung in den Jahren 2005 und 2006 trug ebenfalls zu unterschiedlichen Response-Patterns der untersuchten Parameter bei; dieser Einfluss war geringer als die Faktoren Standort und Pflanzenentwicklung. Nimmt man aber das extreme Jahr 2007 (Standort Oberviehhausen) mit in die Auswertungsmatrix hat die Witterung einen deutlich prominenteren Einfluss auf die Bodenqualität als die bereits erwähnten Parameter. Schließlich wurde auch eine Wirkung der untersuchten Kartoffelsorten auf die untersuchten mikrobiellen Populationsstrukturen gefunden. Diese war aber vergleichsweise gering. Der Einfluss der transgenen Linien war in keinem Fall größer als die gemessenen Sorteneffekte. Allerdings unterschieden sich beide Sorten in den untersuchten Response-Parametern, was mit den Untersuchungen des jeweiligen Phänotyps der beiden transgenen Linien korrelierte (Abbildung).

Eine Verallgemeinerung der Ergebnisse auf andere transgene Linien mit anderen phänotypischen Eigenschaften ist natürlich nicht möglich. Eine entsprechende Bewertungsmatrix sollte „case by case“ erarbeitet werden.

Site and management (comparison of Roggenstein and Oberviehhausen)



(aus dem Bericht von M Schloter: **Abbildung 33**: Ableitung eines integrierten Bewertungsschemas für den Einfluss der beiden untersuchten transgenen Linien SR47 und SR48 im Bezug auf die Qualität von Böden verglichen mit anderen Faktoren)

5. Fortschritte:

Im Projektzeitraum sind keine wesentlichen neuen Erkenntnisse bekannt geworden. Durch den Einsatz der „High throughput“-Sequenzierung in der mikrobiellen Ökologie sind nun aber auch Studien möglich mit denen nicht nur bekannte mikrobielle Gene verfolgt werden können, sondern ein gesamter Fingerabdruck der mikrobiellen Gemeinschaft im Bezug auf deren Funktionen möglich ist. Durch diesen Ansatz wird es in Zukunft möglich sein, Fragen nach möglichen Sicherheitsrisiken bei der Freisetzung transgener Pflanzen noch detaillierter zu beantworten.

6. Erfolgte oder geplante Publikationen:

Neben den Publikationen, die unter der Federführung von Dr. M. Schloter (TU München) und Frau Prof. Dr. Berg (TU Graz) in Vorbereitung sind, befinden sich folgende Manuskripte im Druck Publikationen bzw. zur Einreichung fertiggestellt:

Weinert, N., R. Meincke, C. Gottwald, V. Radl, X. Dong, M. Schloter, G. Berg, and K. Smalla. 2009. Effects of genetically modified potatoes with increased zeaxanthin content on the abundance and diversity of rhizobacteria with in vitro antagonistic activity do not exceed natural variability among cultivars. Plant and Soil DOI 10.1007/s11104-009-0024-z

Weinert, N., R. Meincke, C. Gottwald, H. Heuer, N.C.M. Gomes, M. Schlöter, G. Berg, and K. Smalla. 2009. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3859-3865

Nicole Weinert, Remo Meincke, Michael Schlöter, Gabriele Berg and Kornelia Smalla. Soil microbial communities affected by genetically modified plants? *in* R. Mitchell, J.-D. Gu (ed.) *Environmental Microbiology*. im Druck

Nicole Weinert, Remo Meincke, Christine Gottwald, Holger Heuer, Michael Schlöter, Gabriele Berg, and Kornelia Smalla. Microbial life in the geocaulosphere: influence of plant genotype and site. eingereicht (*FEMS Microbiology Ecology*)

Nicole Weinert, Yvette Piceno, Remo Meincke, Holger Heuer, Gabriele Berg, Michael Schlöter, Gary Andersen and Kornelia Smalla. Bacterial diversity in the rhizosphere of potato plants: site and cultivar effects revealed by PhyloChip analysis. Zur Einreichung für *The ISME Journal* in Vorbereitung

III Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen (in leicht modifizierter Form entnommen aus dem Abschlussbericht des Verbundkoordinators):

Das Projekt hatte einen direkten Bezug zu den Förderrichtlinien „Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten“, Bekanntmachung des BMBF vom 1.12.2003. Gefördert werden sollten Forschungsansätze für die freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung, unter anderem auch spezifische Forschungsansätze zur Untersuchung der Auswirkungen gentechnisch veränderter Kartoffeln auf die Bodenmikroflora (Unterpunkt KARTOFFEL). Während in anderen Vorhaben häufig nur die Effekte der transgenen Linien mit denen des Wildtyps verglichen werden, konnten durch den gewählten multifaktoriellen Ansatz (verschiedene Sorten; zwei Standorte; mehrere Vegetationsperioden; unterschiedliche Pflanzenentwicklungsstadien) mögliche Unterschiede in den Response-Parametern zwischen der Ausgangssorte Baltica und den beiden transgenen Linien SR47 und SR48 bewertet werden, da nur Unterschiede, die über diese „natürliche“ Variabilität hinausgehen sicherheitsrelevant im Sinne des GenTG sind. Alle gewählten Responseparameter hatten einen direkten Bezug zu Bodenqualität und Bodengesundheit (Kohlenstoff- und Stickstoffumsatz; Biokontrolle) und sind damit im Sinne des Bundesbodenschutzgesetzes hochrelevant für eine mögliche Bewertung von Effekten. Es wurde auch versucht, soweit dies in Freilandexperimenten möglich ist, Änderungen im Pflanzenmetabolismus und der – physiologie mit der Dynamik mikrobieller Populationen in der Rhizosphäre zu verknüpfen.

Das Projekt hatte nicht zum Ziel zu klären, inwieweit der Anbau der Zeaxanthin-haltigen transgenen Kartoffellinien zu einer Verbesserung der menschlichen Gesundheit beiträgt. Die ausgewählten Linien hatten entsprechend eher modellhaften Charakter und sollten zeigen, inwieweit durch den gewählten multifaktoriellen Ansatz die untersuchten Parameter empfindlich erfasst werden konnten. Obwohl die Ergebnisse zeigen, dass der gewählte multifaktorielle Ansatz eine völlig neue Qualität an Daten liefert, sind die Ergebnisse aus dieser Studie nicht auf andere transgenen Linien übertragbar. Nach wie vor sind „case by case“-Betrachtungen für jede einzelne Linie nötig.

2. Zusammenfassende Ergebnisse:

Aus den gewonnenen Daten konnten folgende Ergebnisse abgeleitet werden (diese Zusammenfassung enthält relevante Punkte aus der Zusammenfassung des Abschlussberichts des Verbundkoordinators) :

- Die Veränderung eines Gens in transgenen Pflanzen führt zu einer Veränderung des pflanzlichen Phänotyps, der über die Modifikation des veränderten Gens hinausgeht, da die Pflanze versucht, die veränderte genetische Netzwerkstruktur über alternative Stoffwechselwege zu kompensieren.
- Transgene Pflanzen mit dem potentiell gleichen Phänotyp (SR47 und SR48), die durch unterschiedliche genetische Modifikationen hergestellt wurden, unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Unterschiede in der assoziierten Mikroflora in der Rhizosphäre und der Geocaulosphäre konnten sowohl für den Anteil und die Diversität der bakteriellen Antagonisten als auch in den Bakterien- und Pilzfingerprints nachgewiesen werden.
- Die Unterschiede im Phänotyp zwischen transgenen Pflanzen und Wildtyp sind deutlich geringer als Sortenvariabilitäten. Auch die Fingerprints der dominanten Bakterien oder verschiedener Bakteriengruppen waren ähnlicher zur Ausgangslinie „Baltica“, als die Fingerprints der kommerziellen Sorten.
- Die Eigenschaft der transgenen Pflanzen (Zeaxanthin-Akkumulation in den Knollen) bleibt unter Feldbedingungen erhalten. Der gewählte Promotor besitzt eine hohe Spezifität für die Induktion von Transformationsprozessen in den Knollen. Effekte der Zeaxanthin-Anreicherung in den Knollen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft waren geringer als die Sortenvariabilität.
- Die Untersuchungen zur taxonomischen Zusammensetzung der Bakterien in der Rhizosphäre mit PhyloChips und 16S-Klonbibliotheken zeigten übereinstimmend, dass *Alphaproteobacteria* in der Rhizosphäre an beiden Standorten und bei allen drei Sorten dominant waren. PhyloChip-Untersuchungen zeigten aber auch, dass die sogenannten „operational taxonomic units“ (OTU), die zu den *Alphaproteobacteria* gehören, am häufigsten zu den Unterschieden zwischen den Standorten beitragen. Interessanterweise sind es die OTUs, die zu den *Enterobacteriaceae* gehören, die zu den Unterschieden zwischen den Sorten beitragen.

3. Verwertungsplan: (Verwertungsplan ist leicht modifiziert nach dem Abschlussbericht des Verbundkoordinators)

- Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen: nicht relevant; das Projekt hatte zum Ziel bestehende Methoden auf Ihre Nutzbarkeit für Fragen der Sicherheitsforschung zu untersuchen und neue Konzepte für die Sicherheitsforschung zu entwickeln.
- Wirtschaftliche Erfolgsaussichten: nicht relevant; das Projekt verfolgte nicht das Ziel einen kommerziellen Anbau der beiden transgenen Linien (SR47 und SR48; Zeaxanthin-Anreicherung) zu unterstützen, sondern Strategien für die Sicherheitsforschung zu entwickeln; die beiden transgenen Linien hatten nur modellhaften Charakter.
- Wissenschaftliche Erfolgsaussichten: Insgesamt liefern die Ergebnisse nicht nur neue Erkenntnisse über die Wirkung transgener Pflanzen auf die Bodenqualität und –gesundheit, sondern generell über die Interaktionen von Pflanzen und Mikroorganismen im Boden; entsprechend sind die gewonnenen Daten von potentiell Interesse für Ökologen, Agrarwissenschaftler und Pflanzenzüchter. Die Daten werden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften publiziert (siehe oben) und so der interessierten Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Ebenso werden und wurden die Daten auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert (Eurosoil 2008, Wien; ISBGMO, Wellington, Neuseeland 2008); die Zusammenfassung der Daten wird auch auf Veranstaltungen zum Thema „Chancen und Nutzen der grünen Gentechnik“ mit der breiten Öffentlichkeit diskutiert. Eine Präsentation der Ergebnisse im Internet auf der Seite „www.biosicherheit.de“ bzw www.biosaftey.com ist erfolgt.
- Anschlussfähigkeit: Die Daten dienen auch als Grundlage für die Entwicklung von generellen Konzepten für die Sicherheitsforschung und ein Anbaubegleitendes Monitoring; diese Diskussion findet im Moment gerade sowohl im Rahmen von Initiativen des VDI (Verband deutscher Ingenieure) des DIN und der ISO statt. Ferner ist geplant in zukünftigen Feldversuchen, die Übertragbarkeit des Konzeptes auf andere transgene Pflanzen zu überprüfen, vor allem auf Konstrukte in denen potentiell toxische Produkte gebildet werden. Um einen noch engeren link zwischen Pflanzenphänotyp und Mikroflora der Rhizosphäre bzw. Streuschicht herzustellen, sollen in Zukunft auch vermehrt stabile Isotope (vor allem ¹³C markiertes CO₂) eingesetzt werden um Flüsse der Assimilate bzw. von Streuabbauprodukten im Boden verfolgen zu können und die Bedeutung einzelner Mikroorganismengruppen besser darstellen zu können. Hierzu bieten neue Ansätze der „High throughput“ Sequenzierung auch von bis dato völlig unbekanntem Funktionseinheiten eine ideale Voraussetzung.

4. Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben:

5. Präsentationsmöglichkeiten:

Die Daten wurden bereits auf verschiedenen Konferenzen vorgestellt. Auch im Rahmen der BMBF Statusseminare erfolgte eine Darstellung der Ergebnisse. Die Ergebnisse wurden und werden nach „peer review“ in wissenschaftlichen Journalen publiziert.

6. Einhaltung von Ausgaben- und Zeitplanung:

Ausgabenplanung: Die Kosten wurden wie im Bewilligungsbescheid bzw. nach entsprechenden durch den Projektträger genehmigten Änderungen verwendet. Zeitplan: Es erfolgte eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes zum Abschluss der experimentellen Arbeiten erfolgte bis zum 31.7.2008. Die Abgabe des Abschlussberichtes erfolgte bis zum 20.5.2009 (ursprüngliches Abgabedatum: 31.1.2009) bedingt durch den Tod des auf dem Projekt an der TU Graz beschäftigten Doktoranden Remo Meincke musste die Auswertung beider Teilprojekte zum Teil von Nicole Weinert geleistet werden.

IV Kurzfassung

Ziel des Projektes war es zu klären ob transgene Kartoffellinien, die Zeaxanthin in den Knollen überexprimieren, die Qualität landwirtschaftlich genutzter Böden verändern. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Konstrukte (Cosuppression; Antisense) ausgewählt. Um die Ergebnisse bewerten zu können wurden neben dem Wildtyp auch mehrere klassische Sorten mit untersucht. Durch die Freisetzung an zwei unterschiedlichen Standorten in drei aufeinander folgenden Jahren sollte eine Generalisierbarkeit der Ergebnisse ermöglicht werden. Folgende Ergebnisse können aus den vorliegenden Daten abgeleitet werden:

- Die Veränderung eines Gens in transgenen Pflanzen führt zu einer Veränderung des pflanzlichen Phänotyps, der über die Modifikation des veränderten Gens hinausgeht, da die Pflanze versucht die veränderte genetische Netzwerkstruktur über alternative Stoffwechselwege zu kompensieren.
- Transgene Pflanzen, mit dem potentiell gleichen Phänotyp (SR47 und SR48), die durch unterschiedliche genetische Modifikationen hergestellt wurden, unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Unterschiede in der assoziierten Mikroflora in der Rhizosphäre und der Geocaulosphäre konnten sowohl für den Anteil und die Diversität der bakteriellen Antagonisten als auch in den Bakterien- und Pilzfingerprints nachgewiesen werden.
- Die Unterschiede im Phänotyp zwischen transgenen Pflanzen und Wildtyp sind deutlich geringer als Sortenvariabilitäten. Auch die Fingerprints der dominanten Bakterien oder verschiedener Bakteriengruppen waren ähnlicher zur Ausgangslinie Baltica, als die Fingerprints der kommerziellen Sorten.
- Die Eigenschaft der transgenen Pflanzen (Zeaxanthin Akkumulation in den Knollen) bleibt unter Feldbedingungen erhalten. Der gewählte Promotor besitzt eine hohe Spezifität für die Induktion von Transformationsprozessen in den Knollen. Effekte der Zeaxanthinanreicherung in den Knollen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft waren geringer als die Sortenvariabilität.
- Die Untersuchungen zur taxonomischen Zusammensetzung der Bakterien in der Rhizosphäre mit PhyloChips und 16S Klonbibliotheken zeigten übereinstimmend, dass *Alphaproteobacteria* in der Rhizosphäre an beiden Standorten und bei allen drei Sorten dominant waren. PhyloChip Untersuchungen zeigten aber auch, dass die sogenannten „operational taxonomic units“ (OTU), die zu den *Alphaproteobacteria* gehören, am häufigsten zu den Unterschieden zwischen den Standorten beitragen. Interessanterweise sind es die OTUs, die zu den *Enterobacteriaceae* gehören, die zu den Unterschieden zwischen den Sorten beitragen.