

Kontakt von *Agrobacterium* mit Wundrandzellen als Vorbedingung für eine Tumorinduktion

Contact of *Agrobacterium* with Wound Cells as a Prerequisite of Tumor Induction

Rolf Beiderbeck

Botanisches Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. 31 c, 317—318 [1976]; eingegangen am 27. Januar/9. März 1976)

Agrobacterium, Plant Tumor, Attachment, Activated Charcoal

Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens* on *Kalanchoe* leaves is suppressed by charcoal mixed with the inoculum. The inhibition works best with a certain mass relation between bacteria and charcoal. The bacteria become adsorbed to the charcoal particles and in this state they are unable to induce tumors. If charcoal is added to bacteria-infected wounds only 15 min after infection it is not interfering with tumor formation. These results are supporting the hypothesis of sites in the wound to which *Agrobacterium* has to be attached to incite tumors.

Agrobacterium tumefaciens induziert an vielen dikotylen Pflanzen Tumoren. Vorbedingung für eine erfolgreiche Infektion ist eine Verwundung der Pflanze; Infiltration der Bakterien in die Interzellularen führt nicht zur Tumorbildung¹. Trotz der Notwendigkeit einer Wunde gelangen die Bakterien aber nicht in intakte pflanzliche Zellen hinein, denn sorgfältige elektronenmikroskopische Untersuchungen haben nie Agrobakterien in Wundrandzellen aufzeigen können^{2,3}. Es wird daher heute angenommen, daß die Agrobakterien eine zeitlang lebend und wachsend in der Nähe der wundstimulierten Pflanzenzellen verbringen müssen, um ein tumorinduzierendes Prinzip zu produzieren und an die Zellen abzugeben^{4,5}. Die hier berichteten Experimente zur Hemmung der Tumorinduktion mit Aktivkohle zeigen, daß die Gegenwart der Bakterien in der Wunde nicht genügt, sondern daß ein direkter Kontakt der Bakterien mit den kompetenten Pflanzenzellen nötig ist, damit ein Tumor induziert werden kann.

Material und Methoden

Anzucht der Bakterien: *A. tumefaciens*, Stamm B6, wurde in Nährbrühe⁶ oder synthetischer Nährlösung⁷ für 2 Tage bei 30 °C unter Belüftung kultiviert. Bakterienzahlen wurden durch Messung der Extinktion bei 660 nm (Spectronic 20, Bausch und Lomb) bestimmt. Einer Extinktion von 0,1 entsprechen $1,8 \times 10^8$ CFU/ml (colony forming units per ml)⁸. Plattieren erfolgte auf Nährbrühe mit 1,5% Agar.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Beiderbeck, Botanisches Institut, Im Neuenheimer Feld 360, D-6900 Heidelberg.

Färbung der Bakterien: Bakterienhaltige Suspensionen wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Lösung von Acridinorange (1:5000) gemischt. Mit Hilfe eines Zeiss-Mikroskops mit Fluoreszenz-Zusatz (Erregerfilter I, Sperrfilter 65) wurden die Bakterien sichtbar gemacht.

In vitro Experimente mit Bakterien und Aktivkohle: 4 ml Bakteriensuspension wurden mit Aktivkohle (p.a. Merck) versetzt, 15 min bei Zimmertemperatur stehen lassen und erneut gründlich gemischt. Das Gemisch wurde nun genau 4 min absetzen lassen, vom Überstand wurden 1,5 ml abpipettiert, mit Wasser verdünnt und die Konzentration suspendierter Teilchen (restliche verbliebene Kohlepartikel + Bakterien) durch Messung der Extinktion bei 660 nm bestimmt. Die Höhe des Sedimentes in den Probengläsern wurde mit mm-Papier gemessen.

Bestimmung des Infektionserfolges bei der Tumorinduktion geschah mit Hilfe des Igel-Tests⁹ durch Infektion verwundeter Blätter von *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr. mit Bakteriensuspensionen. 3 Wochen nach der Infektion wurde der Infektionserfolg I (Zahl Tumoren/Zahl Wunden) bestimmt. Bei Experimenten zum Einfluß von Aktivkohle auf den Infektionsvorgang wurden 5 ml Bakteriensuspension bzw. Aqua dest. mit der gewünschten Menge Kohle versetzt und sofort unter ständigem Durchmischen auf die Blätter aufgetragen. Alle infizierten Pflanzen wurden im Gewächshaus aufgestellt. Experimente, bei denen die Wirkung der kurzfristig nach der Infektion aufgetragenen Kohle untersucht wurde, wurden für 2 Stunden in einer Klimakammer bei 25 °C und 5000 lx begonnen und anschließend im Gewächshaus weitergeführt.

Ergebnisse

Im Verlaufe von Untersuchungen zum Infektionsmechanismus des *Agrobacterium tumefaciens* wurden *Kalanchoe*-Blätter mit Bakterien infiziert, denen verschiedene Adsorbentien wie Aktivkohle, Kieselgur oder Sephadex zugesetzt waren. Dabei hemmte allein die Aktivkohle die Bildung von Tumoren. Bei Zugabe von 20 mg Kohle zu $1,8 \times 10^6$ CFU in 1 ml war maximale Hemmung erreicht, Steigerung der Kohlekonzentration ergab keine weitere Hemmung mehr. Dagegen konnte eine Erhöhung der Bakterienkonzentration auf $1,8 \times 10^8$ CFU/ml die Hemmung vollständig beseitigen; nur ein bestimmtes Verhältnis von Kohlemenge und Bakterienzahl ergibt optimale Hemmung.

Die Tumorbildung wird durch Aktivkohle jedoch nur dann gehemmt, wenn die Kohle zugleich mit den Bakterien oder schon vor den Bakterien in die pflanzliche Wunde gelangt. Schon 15 min nach den Bakterien applizierte Kohle beeinträchtigt die Tumorbildung nicht mehr (Tab. I). Die Kohle interferiert zu einem sehr frühen Zeitpunkt mit dem Vorgang der Tumortransformation.

Tab. I. Die Wirkung von Aktivkohle auf die Tumorinduktion bei Zugabe zu verschiedenen Zeiten nach oder vor der Infektion mit B6. Eingesetzt $1,8 \times 10^6$ CFU/ml und 20 mg Kohle pro ml. Angegebene Mittelwerte aus 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen.

Behandlung	Infektionserfolg I (Tumoren/Wunden)
B6	0,82 (0,13)
B6+Kohle	0,08 (0,05)
B6, 15 min danach Kohle	0,80 (0,15)
B6, 90 min danach Kohle	0,74 (0,17)
B6, 24 h danach Kohle	0,88 (0,05)
Wunde, 24 h danach B6	0,40 (0,05)
Wunde+Kohle, 24 h danach B6	0,14 (0,02)

Dies geschieht nicht durch Abtöten der Bakterien. Auf Agarplatten wird durch Zusatz von 20 mg/ml Aktivkohle das Wachstum der Bakterien nicht verändert, die Zahl der Kolonien pro Platte bleibt unbeeinflusst. Dagegen haben verschiedene Versuche gezeigt, daß Agrobakterien leicht an Kohlepartikel adsorbiert werden:

- Gemischte Suspensionen aus *Agrobacterium* und Kohle lassen bei Zentrifugation die Bakterien mit der Kohle zusammen sedimentieren.
- In Gegenwart von *Agrobacterium* aggregieren Kohlepartikel und sedimentieren schneller und vollständiger als in Abwesenheit der Bakterien.
- Färbung von Gemischen aus *Agrobacterium* und Kohle mit Acridinorange zeigt die Bakterien fein verteilt auf der Oberfläche der Kohlepartikel.

Diese Adsorption der Bakterien an Kohle, ein rasch erfolgender Vorgang, scheint verantwortlich für die Wirkung von Kohle auf den Transformationsvorgang.

Diskussion

Kohlepartikel setzen die Fähigkeit einer Suspension von *Agrobacterium tumefaciens* zur Tumorinduktion stark herab. Werden $1,8 \times 10^6$ CFU/ml mit 20 mg Kohle pro ml vermischt, so sinkt die Infektivität der Suspension auf einen Wert, der 1 bis 5×10^4 CFU/ml entspricht⁹. Dabei bleibt die Lebens- und Teilungsfähigkeit der Bakterien unbeeinträchtigt. Die an Kohle adsorbierten Bakterien können offenbar keine Tumortransformation bewirken, obwohl sie lebensfähig, im Wundsaft versorgt und in der Nähe wundstimulierter Pflanzenzellen vorkommen. Alle diese Bedingungen sind nicht hinreichend für eine Tumorinduktion. Vielmehr benötigen die Bakterien in der Wunde für eine gewisse Zeit ein uneingeschränktes Bewegungsvermögen. Läßt man nämlich den Bakterien 15 min Zeit bevor die Kohle zugegeben wird, dann kann die Tumorbildung normal ablaufen. Offenbar sind die Bakterien in 15 min dahin gelangt, wo sie für eine Tumorinduktion sein müssen: an die bereits früher postulierten „attachment sites“¹⁰⁻¹² in der Wunde. Die „attachment“-Hypothese erfährt somit durch die hier berichteten Ergebnisse eine unabhängige Stützung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für finanzielle Unterstützung, Frau R. Hohl für sorgfältige Mithilfe bei den Untersuchungen.

¹ C. Stapp, Pflanzenpathogene Bakterien, Paul Parey, Berlin, Hamburg 1958.

² H. R. Hohl, Dissertation Eidgen. TH, Zürich 1961.

³ M. Gee, C. N. Sun u. J. D. Dwyer, Protoplasma **64**, 195 [1967].

⁴ T. Stonier, R. E. Beardsley, L. Parson u. J. McSharry, J. Bacteriol. **91**, 266 [1966].

⁵ A. C. Braun, Plant Physiology (ed. F. C. Steward), Bd. 5, Academic Press, New York 1969.

⁶ J. A. Lippincott u. G. T. Heberlein, Amer. J. Bot. **52**, 396 [1965].

⁷ M. Bopp, Z. Naturforsch. **20b**, 899 [1965].

⁸ R. Beiderbeck, Z. Pflanzenphysiol. **69**, 163 [1973].

⁹ R. Beiderbeck, Z. Naturforsch. **25b**, 407 [1970].

¹⁰ B. B. Lippincott u. J. A. Lippincott, J. Bacteriol. **97**, 620 [1969].

¹¹ R. A. Schilperoort, Dissertation Leiden 1970.

¹² R. Beiderbeck, Z. Naturforsch. **28c**, 198 [1973].