

## Bakterienwand und Tumorinduktion durch *Agrobacterium tumefaciens*

Bacterial Cell Wall and Tumor Induction by *Agrobacterium tumefaciens*

ROLF BEIDERBECK

Botanisches Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. 28 c, 198–201 [1973]; eingegangen am 6. November 1972/22. Januar 1973)

Bacterial cell walls, penicillin, plants, tumors

Bacterial cell walls are concerned with the tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens* on leaves of *Kalanchoe* in two different ways: 1. If an inoculum of the virulent strain B6 of *A. tumefaciens* is mixed with cells of the avirulent strain IIBNV6 or with high concentrations of cell wall preparations from B6 itself tumor induction is inhibited. The same is true with cell wall preparations which were treated with ether or chloroform. *In vitro* growth of the bacteria is not influenced by cell wall preparations. 2. Penicillin inhibits tumor induction by inhibiting bacterial growth. Addition of penicillin as late as 8 hours after infection is still inhibiting tumor initiation. Growth of induced tumors is not inhibited by penicillin.

The meaning of the two cell wall related processes in tumor induction is discussed.

Bei einer Reihe von bakteriellen Pflanzenkrankheiten kann der Wirt durch avirulente Zellen des Erregers vor der Infektion geschützt werden<sup>1–3</sup>. Einer der dabei diskutierten Mechanismen betrifft die Zelloberfläche der Bakterien<sup>4</sup>. Daß diese als Träger spezifischer Strukturen dienen kann, zeigen viele Experimente mit Phagen an den unterschiedlichsten Bakterien<sup>5</sup>. Es gibt nun Anzeichen dafür, daß auch bei der Induktion pflanzlicher Wachstumsanomalien durch intakte Agrobacterien oder Rhizobien die bakterielle Zellwand eine wichtige Rolle spielt: So ist es möglich, die Virulenz von *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium* durch Anzucht der Bakterien in Glycin oder D-Aminosäuren zu vermindern<sup>6–8</sup>. Fixierte L-Formen von *Agrobacterium* sind durchweg unfähig, Tumoren zu induzieren<sup>9</sup>; und avirulente Stämme von *A. tumefaciens* können mit virulenten um Infektionsorte in der pflanzlichen Wunde konkurrieren<sup>3,10,11</sup>. Der Mechanismus solcher wandabhängiger Prozesse ist unklar. Weitere Daten dazu aus Experimenten zur Tumorinduktion an *Kalanchoe daigremontiana* durch *A. tumefaciens* sollen hier beigetragen werden.

### Material und Methoden

Die Stämme B6 (Bopp) und IIBNV6 (Stonier) von *A. tumefaciens* wurden bei 30 °C unter Begasung mit Luft in vollsynthetischem Medium<sup>6</sup> oder in Nähr-

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. BEIDERBECK,  
D-6900 Heidelberg, Hofmeisterweg 4 (Inst. f. Botanik).

brühe<sup>12</sup> kultiviert. Plattieren erfolgte auf dem gleichen Medium<sup>12</sup> nach der Weichagar-Methode.

Zellkonzentrationen wurden bestimmt durch Messung der Extinktion bei 660 nm im Spectronic 20 (Bausch & Lomb). Einer Extinktion von 0,1 entsprachen  $1,8 \cdot 10^8$  koloniebildende Bakterien (colony forming units per ml; CFU/ml) pro ml B6.

Präparation von Zellwandanreicherungen geschah durch Erhitzen der Bakterien auf 75 °C, Schütteln mit Glasperlen von 0,35 mm Durchmesser (Bühler-Homogenisator) und differentielle Zentrifugation<sup>13</sup>. Zellwandpräparationen in TM-Puffer (0,0025 M Tris,  $10^{-4}$  M MgSO<sub>4</sub>, pH eingestellt mit HCl auf 8,0) wurden mit  $\frac{1}{2}$  Vol. Chloroform oder Äther versetzt, 15 min geschüttelt. Die weiße feste Phase wurde abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet, in TM-Puffer resuspendiert und zur Inokulation verwendet.

Hitzbehandlung der Bakterien erfolgte in TM-Puffer bei 70 °C für 15 min.

Die Fähigkeit der Bakteriengemische zur Tumorinduktion wurde an jungen Blättern von *Kalanchoe daigremontiana* getestet<sup>14</sup>, ebenso wurde das Tumorgewachstum bestimmt.

### Ergebnisse

Die Zahl der an Blättern von *Kalanchoe* induzierten Tumoren wird deutlich reduziert, wenn dem Inokulum ( $9 \cdot 10^5$  bis  $1,9 \cdot 10^6$  CFU/ml B6) Zellen des avirulenten Stammes IIBNV6 beigemischt werden (Tab. I). Das Ausmaß dieser Hemmung ist von der Zahl der beigemischten avirulenten Bakterien abhängig. Komplette Hemmung wird erzielt, wenn etwa 400 mal so viele IIBNV6 im Inokulum vorhanden sind wie Zellen des virulenten Stammes B6.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Hemmung der Tumorinduktion durch verschiedene Konzentrationen des avirulenten *A. tumefaciens* IIBNV6. Infiziert wurden je Experiment und Versuchsglied 5 Pflanzen an 2 jungen Blättern mit 60 Wunden. Auswertung erfolgte nach 3 Wochen. Zahlen der Tabelle geben den relativen Infektionserfolg (Anzahl Tumoren/Anzahl Wunden). B6 und IIBNV6 wurden zur Herstellung des Inokulums im Verhältnis 1:1 gemischt.

Zusatz [CFU/ml]	Konzentrationen von B6 [CFU/ml]	
	$9 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^6$
Tris	0,67	0,59
IIBNV6; $3,6 \cdot 10^6$	0,40	0,64
IIBNV6; $3,6 \cdot 10^7$	0,32	0,56
IIBNV6; $3,6 \cdot 10^8$	0,08	0,15

Im Gegensatz dazu können hitzegetötete B6-Zellen die lebenden B6 nicht an der Tumorbildung hindern, auch nicht bei 400-fachem Überschuß (Tab. II). Wohl

Tab. II. Infektion von *Kalanchoe*-Blättern mit Gemischen von B6 und hitzegetöteten B6. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I, hier angegeben Mittelwerte aus 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen. Im Inokulum stets ein Gemisch aus 1 Teil B6 ( $9 \cdot 10^5$  CFU/ml) und 1 Teil hitzegetöteter B6.

Zusatz [CFU/ml]	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
Tris	0,655 (0,034)
hitzegetötete B6	
$3,6 \cdot 10^7$	0,645 (0,054)
$3,6 \cdot 10^8$	0,661 (0,050)

aber sind hohe Konzentrationen von Zellwandreicherungen des Stammes B6 in der Lage, Tumorinduktion durch lebende B6 zu unterdrücken (Tab. III).

Tab. III. Hemmung der Tumorbildung durch Zellwandpräparationen von *A. tumefaciens* B6. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I. Für die Herstellung des Inokulums wurden  $9 \cdot 10^7$  —  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml von B6 mit den Wandpräparationen im Verhältnis 1:1 gemischt.

Zusatz [CFU/ml]	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]		
Tris	0,84	0,59	0,52
Wandpräp. von B6 aus			
$3,7 \cdot 6,3 \cdot 10^8$	0,73	0,43	0,35
$3,7 \cdot 6,3 \cdot 10^9$	0,50	0,28	0,26
$3,7 \cdot 6,3 \cdot 10^{10}$	0,21	0,08	0,05

Ähnliche Ergebnisse hat bereits LIPPINCOTT bei der Infektion von Pinto-Bohnen feststellen können (J. A. LIPPINCOTT, pers. Mitteilung). Behandlung der Zellwandpräparationen mit Chloroform oder Äther beseitigt ihre hemmenden Eigenschaften nicht

Tab. IV. Hemmung der Tumorinduktion durch Zellwandpräparationen von B6 nach Extraktion mit organ. Lösungsmitteln. Bestimmung des Infektionserfolgs wie Tab. I. Im Inokulum wurden  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml B6 gemischt mit Zellwandpräparationen von  $6,3 \cdot 10^{10}$  CFU/ml B6 im Verhältnis 1:1. Infektion erfolgte an relativ alten Pflanzen, daher verminderter Infektionserfolg bei allen Zusätzen.

Zusatz	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]	
Tris-Puffer	0,33	0,25
Wandpräparation	0,05	0,01
" ätherbeh.	0,05	0,05
" chlorof. beh.	0,11	0,04

(Tab. IV), auch solche auf Lipide extrahierten Wände unterdrücken die Tumorinduktion durch lebende B6. Dabei handelt es sich nicht um eine direkte Einwirkung der Zellwandpräparationen auf das bakterielle Wachstum: das Wachstum von *A. tumefaciens* B6 wird durch Beimischung von Zellwandpräparationen (gewonnen aus B6) nicht behindert (Tab. V).

Tab. V. Einfluß von Zellwandpräparationen aus B6 auf das Wachstum von B6 auf Nähragar-Platten bei Plattierung nach der Weichagar-Methode (dreifache Plattierungen). Vor dem Plattieren wurde ungefähre Bakterienzahl eingestellt, diese mit Zellwandpräparationen gemischt (1:1) und platziert. Nach 48 Std. Inkubation bei  $25^\circ\text{C}$  wurde die Kolonienzahl bestimmt.

Expt.	ungefähre B6-Konz. [CFU/ml]	Zellwandpräp. aus B6 [CFU/ml]	Bakterienzahl nach 48 Std. [CFU/ml]
1	$5 \cdot 10^7$	0	$6,6 \cdot 10^7$
	$5 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^{10}$	$7,0 \cdot 10^7$
2	$5 \cdot 10^6$	0	$5,7 \cdot 10^6$
	$5 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^{10}$	$7,3 \cdot 10^6$
3	$2 \cdot 10^6$	0	$1,6 \cdot 10^6$
	$2 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^{10}$	$2,4 \cdot 10^6$

#### Experimente mit Penicillin

Werden  $1-2 \cdot 10^8$  CFU/ml von *Agrobacterium tumefaciens* B6 mit Penicillin G (1575-1590 U/mg) versetzt und 15 Std. wachsen lassen, so hemmt in den beiden verwendeten Nährmedien eine Konzentration von 9 bis 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin das bakterielle Wachstum vollständig. Das Ausmaß dieser Hemmung hängt jedoch von der Ausgangskonzentration der Bakterien ab, denn wenn die Kulturen mit  $1 \cdot 10^9$  CFU/ml begonnen werden, findet kaum eine Hemmung des Wachstums bei diesen Penicillin-Konzentrationen statt (Tab. VI).

Die Induktion von Tumoren an *Kalanchoe*-Blättern durch den Stamm B6 wird erst durch Konzentrationen zwischen 100 und 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin gehemmt

Tab. VI. Hemmung des bakteriellen Wachstums durch Penicillin auf verschiedenen Nährmedien und mit verschiedener Ausgangskonzentration der Bakterien. Bakterien 15 Stdn. bei 30 °C unter Belüftung gewachsen. Angegeben Mittelwerte aus je 3 Experimenten in % des Wachstums der Kontrollen.

Penicillin [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	Startkonzentration der Bakterien		synthet. Medium
	[ $4 \cdot 10^7$ bis $1,3 \cdot 10^8$ CFU/ml]	[ $7,2$ bis $9,4 \cdot 10^8$ CFU/ml]	
0	100	100	100
9,2	80,6	87,9	102,1
92,0	4,4	5,1	90,6
277,0	2,2	2,4	98,9
554,0	1,8	2,4	89,0
Beginn	2,7	5,6	22,5

(Tab. VII). Ähnliches berichtet DEROPP<sup>15</sup> für andere pflanzliche Tumoren. Unterschiede in der Empfindlichkeit des bakteriellen Wachstums und der Tumorinduktion gegenüber Penicillin können durch Wechselwirkungen zwischen Penicillin und Proteinen der pflanzlichen Wunde erklärt werden<sup>16</sup>.

Tab. VII. Hemmung der Tumorinduktion durch Penicillin. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I. Infektion mit  $1,8 \cdot 10^7$  CFU/ml B6 gemeinsam mit verschiedenen Konzentrationen von Penicillin.

Penicillinkonz. [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
0	0,96
10	0,83
100	0,62
500	0,25

Die durch Penicillin hervorgerufene Hemmung der Tumorinduktion beruht auf der Einwirkung des Antibiotikums auf die in der Wunde befindlichen Bakterien und nicht auf Wechselwirkung des Penicillins mit den Pflanzenzellen. Denn, wie *in vitro* hängt die Wirkung einer gegebenen Konzentration des Penicillins von der Bakterienkonzentration im Inokulum ab (Tab. VIII, vgl. *l. c.*<sup>14</sup>). Außerdem ist das Wachstum einmal angelegter Tumoren durch eine einmalige Gabe von Penicillin 4 Tage nach der Infektion nicht hemmbar (Tab. IX).

Penicillin vermindert die Zahl induzierter Tumoren nicht nur bei gleichzeitiger Gabe von Bakterien und Drogen in die Wunde, sondern auch dann, wenn es 8 Stdn. nach der Infektion zugegeben wird (Tab. X). Diese nachträgliche Hemmung der Tumorinduktion erfolgt auch, wenn zum Zeitpunkt der Infektion die Wunde bereits erste Wundreaktionen durchmachen konnte (Tab. XI).

Tab. VIII. Hemmung der Tumorinduktion (verschiedene Konz. von B6) durch 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I. Angegeben Mittelwerte aus 3 Experimenten. In jedem Experiment wurde bei einer anderen Bakterienkonzentration das Penicillin weggelassen. In Klammern Standardabweichungen.

Bakterienkonz. [ $\text{CFU}/\text{ml}$ ]	rel. Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]	mit Penicillin
$9,5 \cdot 10^8$	—	0,993
$9,5 \cdot 10^7$	0,993	0,877 (0,111)
$9,5 \cdot 10^6$	0,902	0,298 (0,247)
$9,5 \cdot 10^5$	0,278	0,030 (0,036)

Tab. IX. Einfluß von 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin auf das Wachstum von Tumoren, die durch  $1 \cdot 10^8$  CFU/ml von B6 induziert waren. Penicillin wurde 96 Stdn. nach der Infektion auf die Blätter gegeben. Angegeben Daten aus 3 Experimenten, Mittelwerte aus 70-100 Tumordurchmessern 3 Wochen nach der Infektion. Experimente zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt.

Behandlung Tumordurchmesser in Sktl.\*

ohne Penicillin	14,0	20,2	17,0
mit Penicillin	15,0	21,5	19,0

\* 1 Sktl. des Okularmikrometers entspricht 132  $\mu$ .

Tab. X. Hemmung der Tumorinduktion ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml B6) durch 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I. Mittelwerte aus 3 Experimenten, in Klammern Standardabweichungen.

Behandlung	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
ohne Penicillin; B6	0,924 (0,067)
B6 + Penicillin	0,299 (0,234)
B6, nach 8 Stdn. Penicillin	0,271 (0,085)
B6, nach 24 Stdn. Penicillin	0,604 (0,182)
B6, nach 96 Stdn. Penicillin	0,898 (0,060)

Tab. XI. Hemmung der Tumorinduktion ( $1 \cdot 10^8$  CFU/ml B6) durch 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Penicillin bei Infektion 15 Stdn. nach der Verwundung und bei Penicillinbehandlung zu verschiedenen Zeiten danach. Bestimmung des Infektionserfolgs wie in Tab. I. Angegeben Werte aus 2 Experimenten.

Behandlung 15 Stdn. nach der Verwundung	relativer Infektionserfolg [Tumoren/Wunden]
B6	0,54
B6 + Penicillin	0,15
B6, nach 8 Stdn. Penicillin	0,21

## Diskussion

Die Zellwand von *Agrobacterium* scheint mehrfach einen Einfluß auf die Tumorinduktion zu nehmen. Zunächst ist sie bedeutsam für die Anlagerung der Bakterien an die pflanzlichen Zellen. SCHILPEROORT<sup>10</sup> konnte an *Kalanchoe* zeigen, daß Mischung virulenter Zellen von *A. tumefaciens* B6 mit avirulenten Zellen von *A. radiobacter* die Zahl induzierter Tumoren deutlich herabsetzt, obwohl das Wachstum von B6 durch diese Beimischung nicht beeinträchtigt wird. An Pinto-Bohnen wirken Bakterien des avirulenten Stamms IIBNV6 von *A. tumefaciens* ebenso tumorhemmend, wenn sie zusammen mit B6 inkuliert werden<sup>3</sup>. Hier nun kann gezeigt werden, daß IIBNV6 auch im *Kalanchoe*-System die Tumorbildung hemmt. Außerdem wird bewiesen, daß hochkonzentrierte Zellwandanreicherungen von B6 die Tumorinduktion durch lebende B6 stark einschränken. Diese Hemmung wird auch von Zellwandanreicherungen ausgeübt, die mit Lipidlösungsmitteln behandelt waren. Wie *A. radiobacter* so stören auch Zellwandanreicherungen das Wachstum lebender B6 *in vitro* nicht.

Da an eine Wunde von *Kalanchoe* ca. 350 Zellen angrenzen, trifft ein virulent Bakterium (B6) so lange auf freie Wundzellen (und veranlaßt damit Tumorbildung) als nicht ein ca. 350-facher Überschuß von avirulenten Bakterien (IIBNV6) für eine Blockierung der Wundrandzellen sorgt. Hitzegetötete Bakterien verlieren offenbar ganz oder teilweise ihre Fähigkeit, mit lebenden B6 um Wundorte der *Kalanchoe* zu konkurrieren<sup>10</sup>. An Pinto-Bohnen sind auch diese abgetöteten Bakterien fähig, eine Hemmung auf die Tumorinduktion auszuüben<sup>3</sup>.

Das wirksame Prinzip der Induktionshemmung scheint mit der bakteriellen Zellwand verknüpft. Lipide spielen keine Rolle dabei.

Einen ganz anderen Einfluß der Zellwand auf das Induktionsgeschehen beschreiben die Versuche mit Penicillin. Penicillin hemmt die Tumorinduktion auf dem Wege über die Bakterien und zwar auch dann, wenn es viele Stunden nach der Infektion in die pflanzliche Wunde gegeben wird. Offenbar müssen bei der Tumorinduktion durch intakte Bakterien in der Wunde noch Prozesse der Zellwandsynthese ablaufen. Es mag sich dabei um Veränderungen handeln, die die Lockerung der bakteriellen Wandstruktur einleiten (z. B. die Tätigkeit der Mureinhydrolasen<sup>16</sup>) und so die Voraussetzung für den Übergang von Material aus Bakterien in Pflanzenzellen schaffen.

Gedankt sei Fräulein R. MÜLLER für sorgfältige Hilfe bei den Versuchen. Herrn H. KEUTNER für die Anzucht der Testpflanzen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen.

- <sup>1</sup> C. W. AVERRE u. A. KELMAN, Phytopathology **54**, 779 [1964].
- <sup>2</sup> R. N. GOODMAN, Phytopathology **57**, 22 [1967].
- <sup>3</sup> B. B. LIPPINCOTT u. J. A. LIPPINCOTT, J. Bacteriol. **97**, 620 [1969].
- <sup>4</sup> R. NISHIZAWA, Bot. Mag. Tokyo **81**, 89 [1968].
- <sup>5</sup> R. LOSICK u. P. W. ROBBINS, Sci. American **221/5**, 120 [1969].
- <sup>6</sup> M. BOPP, Z. Naturforsch. **20b**, 899 [1965].
- <sup>7</sup> R. E. BEARDSLEY, T. STONIER, J. LIPETZ u. C. L. PARSONS, Cancer Res. **26**, 1606 [1966].
- <sup>8</sup> B. W. STRIJDOM u. O. N. ALLEN, Phytophylactica **1**, 147 [1969].
- <sup>9</sup> M. RUBIO-HUERTOS u. E. CABEZA DE HERRERA, Nature [London] **209**, 1262 [1966].
- <sup>10</sup> R. A. SCHILPEROORT, Diss. Leiden 1970.
- <sup>11</sup> P. MANIGAULT, Ann. Inst. Pasteur **119**, 347 [1970].
- <sup>12</sup> J. A. LIPPINCOTT u. G. T. HEBERLEIN, Amer. J. Bot. **52**, 856 [1965].
- <sup>13</sup> M. R. J. SALTON u. R. W. HORNE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **7**, 177 [1951].
- <sup>14</sup> R. BEIDERBECK, Z. Naturforsch. **25b**, 407 [1970].
- <sup>15</sup> R. S. DEROPP, Phytopathology **39**, 822 [1949].
- <sup>16</sup> R. HARTMANN, J.-V. HÖLTJE u. U. SCHWARZ, Nature [London] **235**, 426 [1972].