

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karl - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Ömer Colak  
aus  
Karacabey - Bursa - Türkei  
1980

UNTERSUCHUNGEN ZUR VIRULENZ  
VON AGROBACTERIUM RHIZOGENES 15834  
FÜR HÖHERE PFLANZEN.

Gutachter: Prof. Dr. R. Beiderbeck.  
Prof. Dr. *A.* Klein.

## INHALTSVERZEICHNIS:

	<u>Seite</u>
<u>EINLEITUNG:</u>	
a) Was ist Tumor?	5
b) Eigenschaften der Agrobakterien.	10
c) Probleme der Arbeit.	17
<u>MATERIAL UND METHODEN:</u>	
1) Bakterien.	20
2) Medien.	21
3) Tests.	25
a) Produktion von Ketolactose.	25
b) Lacmusmilch Reaktion.	26
c) Wachstum bei 35°C.	27
d) Octopin-Abbau.	27
e) Ausbreitung der Bakterien auf Weichagar.	29
f) Verwertung von Citrat.	30
g) Empfindlichkeit für Agrocin 84.	32
h) Virulenz-Test an <i>K. daigremontiana</i> .	33
i) Phagen Test.	34
k) Wachstum auf 1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin.	36

4) Spezielle Methoden:

- a) Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von Acridinorange bzw. Acriflavin. 38
- b) Kultivierung der mit UV behandelten Bakterien in Gegenwart von Acridinorange bzw. Acriflavin. 41
- c) Versuche zur Eliminierung des Plasmids von *A. rhizogenes* 15834 durch Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von Ethidiumbromid. 42
- d) Versuche zur Selektion von avirulenten Mutante von *A. rhizogenes* 15834 auf Grund ihrer Resistenz gegen Agrocin 84 aus *A. radiobacter* 84. 44
- e) Versuche zur Übertragung der Virulenz von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* durch Konjugation auf festem Medium. 47
- f) Durchführung des Experiments in flüssigem Medium. 48
- g) Einfluß der Temperatur auf Transkonjugation. 51
- h) Prüfung auf antibiotische Wirkung eines Bakterienstammes auf einen Anderen. 52
- i) Transkonjugationsexperimente mit anderen Bakterienstämmen. 53

ERGEBNISSE:

A) EXPERIMENTE ZUR PLASMIDELIMINIERUNG

BEI A. RHIZOGENES 15834:

- 1) Versuche zur Virulenzeliminierung durch Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von Acridinen. 54
- 2) Kultivierung der UV behandelten Bakterien in Gegenwart von Acridinorange bzw. Acriflavin. 61
- 3) Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von Ethidiumbromid. 67
- 4) Versuche zur Isolierung spontan avirulentgewordener A. rhizogenes 15834 mit Hilfe der Resistenz gegen Agrocin 84. 71

B) CHARAKTERISIERUNG VON A. RHIZOGENES UND SEINEN DERIVATEN IN BIOLOGISCHEN UND BIOCHEMISCHEN TESTS UND VERGLEICH MIT A. TUMEFACIENS B6-806.

- 1) Produktion von Ketolactose. 74
- 2) Verwertung von Citrat. 74
- 3) Abbau von Octopin. 75
- 4) Lackmusmilch Reaktion. 75
- 5) Wachstum bei 35°C im Schüttelbad. 76

	<u>Seite</u>
6) Ausbreitung der Bakterien auf Weich- agar.	77
7) Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber Agrocin 84.	77
8) Virulenz an <i>K. daigremontiana</i> .	77
9) Produktion von Agrocin.	78
10) Empfindlichkeit für Phagen PS8.	78
C) EXPERIMENTE ZUR ÜBERTRAGUNG DER VIRULENZ VON <i>A. TUMEFACIENS</i> AUF <i>A. RHIZOGENES</i> DURCH KONJUGATION(IN VITRO).	 81
1) Isolierung der antibiotika-resistenten avirulenten Mutante von <i>A. rhizogenes</i> 15834.	83
2) Transkonjugation auf festem Medium.	86
D) STUDIUM EINIGER BEDINGUNGEN DER VIRULENZ- ÜBERTRAGUNG.	
1) Medienkonsistenz.	90
2) Einfluß von Octopin und Octopinverwandten Substanzen auf Virulenzübertragung.	91
3) Verstärkte Wirkung von Octopin in Gegen- wart von Pyruvat.	97

	<u>Seite</u>
4) Einfluß der Temperatur auf die Häufigkeit der Virulenzübertragung.	98
5) Transkonjugation und Bakterienwachstum.	100
E) ÜBERTRAGUNG DER FÄHIGKEIT ZUR TUMORINDUK- TION VON A. TUMEFACIENS AUF WURZELINDUZIEREN- DE A. RHIZOGENES.	102
<u>DISKUSSION</u>	108
<u>LITERATURVERZEICHNIS:</u>	120

## EINLEITUNG:

### a) WAS IST EIN TUMOR?

Durch die Untersuchung der Transformation einzelner, in vitro gezüchteter Zellen gewinnt man die Überzeugung, daß der Krebs aus einem Geschehen hervorgeht, das sich in einer Einzelzelle abspielt. Nachdem die Zelle einmal verändert ist, besitzt sie neue abnorme Eigenschaften, die auf die Tochterzellen genetisch übertragen werden. Dieser Tumor kann generalisiert oder metastasierend sein (maligner Tumor), oder er kann lokalisiert bleiben und eventuell zurückgehen. (benigner Tumor). (E. Jawetz, J.L. Melnick, E.A. Adelberg 1977).

Entsprechend dieser Definition des tierischen Tumors, definiert Braun (1969) die pflanzlichen Tumoren, die in vieler Hinsicht den tierischen Tumoren ähneln, wie folgt:

Echte Pflanzentumoren bestehen aus dauerhaft veränderten, sich mehr oder weniger zufallsorientiert teilenden Zellen. Diese reproduzieren sich identisch und ihr Wachstum kann von der Wirtspflanze nicht angemessen kontrolliert werden.

Solche Tumoren können aus recht unterschiedlichen Ursachen entstehen:

- 1) Genetische Tumoren sind die Konsequenz einer besonderen Genkombination in bestimmten Art-Bastarden. (z.B. - manche *Nicotiana*-Hybriden). (Kostoff 1930).
- 2) Bakterieninduzierte Tumoren (Crown-Gall oder Wurzelhals-Gallen) entstehen an Dicotylen nach Wundinfektion mit *A. tumefaciens*. (Braun, A.C. 1969).
- 3) Virusinduzierte Tumoren werden durch zweisträngige RNS-Viren (z.B. Wound Tumor Virus - WTV - Tumoren) hervorgerufen. (L.M. Black, 1972).
- 4) Habituierte Gewebe treten spontan als Gruppen hormonautotropher Zellen in Gewebekulturen auf. (White, 1949).

Zur Entstehung der zu den echten pflanzlichen Tumoren gehörenden Crown-Gall-Tumoren müssen die Bakterien durch eine Wunde ins Innere der Pflanze gelangen und mit Wundrandzellen in unmittelbarem Kontakt kommen. (Klapwijk 1979). Vielmehr müssen die Bakterien an durch benachbarte Verwundung umgestimmte Zellen herankommen und sich an besondere Orte der Pflanzenzelle, genannt "Tumor-sites", anlagern. (B. Lippincott and Lippincott 1969). Die Gegenwart solcher

"Tumor-sites" wurde durch Konkurrenzversuche nachgewiesen. Z.B. hemmt eine virulente-avirulente Bakterienmischung(1:1) die Tumorinduktion erheblich, obwohl genügend virulente Bakterien im Gemisch vorhanden sind, um eine Tumorinduktion hervorzurufen.(Beiderbeck 1973).

Die Wechselwirkung der Agrobacterien mit den Tumor-sites ist eine schnelle Reaktion. Erfolgt Zugabe der avirulenten nur 15 min nach den virulenten, ist die Tumorbildung kaum beeinträchtigt.(Lippincott and Lippincott 1969).

An verschiedenen Pflanzen ist nachgewiesen worden, daß die Zahl der entstehenden Tumoren mit der Zahl der Bakterien im Inokulum korreliert und je nach Testpflanze  $10^3$ -  $10^6$  Bakterien pro ml benötigt werden, um eine Tumorinduktion zu erzielen. Große Wunden sind leichter zu transformieren als kleine.(Hildebrandt 1940). Der Transformationsprozess ist in frühen Phasen temperatur-empfindlich. Untersuchungen zeigten, daß bei Kalanchoe-Pflanzen die ersten 32 Std. nach Verwundung und Inokulation für eine erfolgreiche Transformation der Pflanzenzelle zur Tumorzelle von großer Bedeutung sind. Wenn die Pflanzen während dieser Zeit bei  $32^{\circ}\text{C}$  gehalten wer-

den, bleibt die Tumorinduktion aus. Nach der Transformation nimmt die mitotische Aktivität der Tumorgewebe-Zellen zu, was bei sterilen Wunden in der selben Zeit nicht zu finden ist. (Kupila and Stern 1961). Es ist möglich, daß innerhalb einer Wunde mehrere Transformationen stattfinden und durch Inokulation mit Bakteriengemische verschiedener Arten, die unterschiedliche Tumoren hervorrufen, gleichzeitige Entstehung unterschiedlicher Tumoren erzielt werden. (Beiderbeck 1973<sub>a</sub>).

Untersuchungen an sterilen Gewebe-Kulturen haben zu besserer Identifizierung des Crown-Gall-Tumor-Gewebes und seiner Eigenschaften beigetragen.

- a) Zur Aufrechthaltung des Tumor-Zustandes ist die Gegenwart der Bakterien nicht notwendig.
- b) Tumorzellen haben oft eine erhöhte Zahl von Chromosomen und erhöhten DNS-Gehalt. (Dons 1975).
- c) Tumor-Gewebe können auf Minimal-Medien, die keine Wachstoffsstoffe wie Auxin, Cytosin und Gibberellin enthalten, weiter wachsen, was die Normal-Gewebe nicht tun. (Schmidt und Brucker 1959).
- d) Crown-Gall-Tumoren sind transplantierbar, d.h. sie können auf gesunde homologe Pflanzen aufgefropft werden und dort anwachsen. (Jensen 1918).

e) Tumorzellen teilen sich unkontrolliert weiter und sind dem Hormonmechanismus der Wirtspflanze nicht unterworfen. (Braun 1958).

f) Tumor-Gewebe enthalten entweder keine Arginase oder ihre Aktivität ist schwächer als in normalen Zellen. (Goldman-Menage 1970). Deshalb häufen sich Arginin und substituierte Guanidine in Tumorzellen. (Menage et al. 1964).

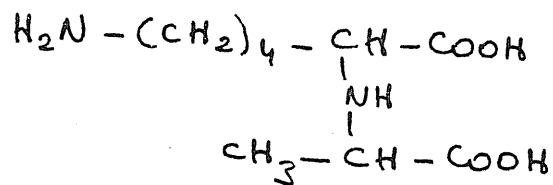
g) In Tumor-Geweben wurden daher ungewöhnliche Arginin-Derivate festgestellt, die in Normal-Geweben fehlen:

Das sind Octopin, Nopalin, Octopinsäure, Lysopin und Histidin-Derivat Histopin. (Bomhof 1974, Kemp 1977, Hooykaas 1979<sub>6</sub>)

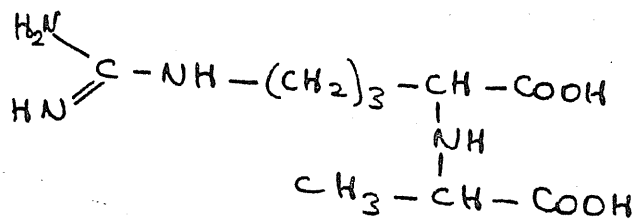
h) In Tumor-Geweben ist die Aktivität einiger oxidativer Enzyme gesteigert. (Rathsack und Brucker 1961, Spurr et al. 1965).

i) Octopin, Nopalin, Lysopin und das in Pflanzengeweben bisher noch nicht gefundene Histidin-Derivat Carnosin fördern das Tumorwachstum an Bohnenblättern. (Lippincott and Lippincott 1970 ). Octopinsäure, Arginin, Histidin, Pyruvat und Ketoglutarat dagegen nicht. Werden zwei der fördernden Substanzen beliebig kombiniert und bei unveränderten Gesamtkonzen-

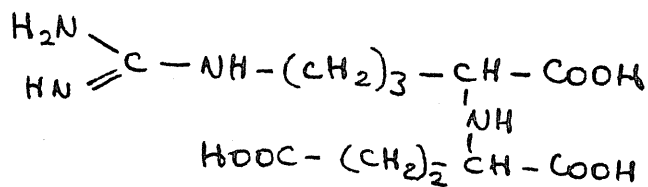
trationen auf die Tumoren aufgebracht, so annullieren sich ihre Wirkungen und der Tumor wächst, als hätte man ihm keine der Substanzen appliziert. (Lippincott et al. 1972).



Lysopin



Octopin



Nopalin

(Nach PETIT et TEMPE' 1975)

#### EIGENSCHAFTEN DER AGROBAKTERIEN:

Nach S. Breed, E.D.G. Murray und N.R. Smith (1957) gehören Agrobakterien zur Familie der Rhizobiaceae. Es sind gram-negative, mit 1-6 Geißeln fortbewegende, stäbchenförmige Bakterien. (0,6-1,0 X 1-3). Ihr Wachstumsoptimum liegt bei 25°-30°C. Bei höheren Temperaturen als 37°C wachsen sie entweder schlecht oder überhaupt nicht.

Agrobakterien sind z.T. Saprophyten(=Avirulent) z.T. Pathogene(=Virulent). Die Pathogene induzieren an vielen Pflanzen verschiedene Wachstumsanomalien. Nach einer Infektion mit virulentem Agrobacterium tumefaciens reagieren 60 % aller untersuchten Gymnospermen und der Dicotylen mit Tumorbildung.(La Rue 1937, Lippincott and Lippincott 1976 v).

Viele Stämme von Agrobakterien sind mittlerweile sehr gut untersucht und je nach ihren Eigenschaften klassifiziert worden:

- 1) Stämme, die organisierte Tumoren induzieren.(z.B.- A. rhizogenes 15834)
- 2) Stämme, die unorganisierte Tumoren induzieren.(z.B. A. tumefaciens Stamm B6-806)
- 3) Stämme, die Teratome bilden.(z.B. A. tumefaciens Stamm T37)
- 4) Stämme, die avirulent sind.(z.B. A. radiobacter Stamm 84)

Untersuchungen haben ergeben, daß die Fähigkeit der Agrobakterien zur Tumor-Induktion von der Gegenwart eines Plasmids, des sog. TI-Plasmids, abhängig ist. Dieses Plasmid ist eine doppel-strängige, ringförmige DNS von 50-80 um Länge und weist ein Mol.Gewicht von 95-156 Megadaltons auf. Seine Länge macht

ungefähr 4 % der gesamt DNS des Agrobacteriums aus. (Currier et al. 1976, Ledebauer et al. 1976, Zaenen et al. 1974).

Das TI-Plasmid verleiht den Stämmen von *A. tumefaciens* in der Regel folgende Eigenschaften:

- a) Virulenz. (Van Larebeke et al. 1974, Watson et al. 1975).
- b) die Fähigkeit zum Abbau der Argininderivate Octopin und/oder Nopalin. (Bomhof et al. 1976).
- c) Empfindlichkeit für Agrocin 84, ein von *A. radiobacter* K84 produziertes Antibiotikum. (Engler et al. 1975).
- d) Ausschluß des Phagen AP1. (Schell 1975).

Verlust dieses Plasmids bedeutet Virulenzverlust und zugleich den Verlust anderer Eigenschaften des Bakteriums.

Obwohl bei *A. tumefaciens* die genannten Eigenschaften in der Regel mit der Virulenz gekoppelt sind, so sind doch inzwischen verschiedene Stämme mit defektem oder modifiziertem TI-Plasmid bekannt geworden. (Engler et al. 1975, Kerr and Roberts 1976). Das TI-Plasmid kann für jede der obengenannten Eigenschaften und für Virulenz getrennt mutieren.

Man hat virulente Stämme von *A. tumefaciens* gefun-

den, die unempfindlich für Agrocin 84 waren. (Engler et al. 1975). Avirulente Stämme sind gefunden worden, die empfindlich für Agrocin 84 sind und Fähigkeit zur Nutzung von Octopin besitzen. (Kerr and Roberts 1976). Auch viele Stämme von *A. radiobacter*, die alle avirulent sind, besitzen große Plasmiden. (Gordon et al. 1976, Lin et al. 1976, Kerr 1980).

Deswegen bleibt als einzig sicheres Kriterium zur Unterscheidung avirulenter Stämme von virulenten die zeitraubende Tumorbildung an Pflanzen.

Die Virulenz des *A. tumefaciens* kann nach verschiedenen Behandlungen vorübergehend oder für immer verlorengehen. Manche dieser Virulenzverluste haben ihre Ursache in einer veränderten Zellwand, z.B. treten nach wiederholter UV-Bestrahlung stabile 'L'-Formen auf, die nicht mehr virulent sind. (Rubio-Huertos et al. 1966). Längere Kultur in 0,1 % Glycin oder in Gegenwart verschiedener D-Aminosäuren vermindert die Wachstumsgeschwindigkeit und Virulenz von *A. tumefaciens*. (Van Lanen et al. 1952, Bopp 1965). Dabei haben die Bakterien erheblich dünnere Zellwände und oft sind die Zellen rund wie 'L'-Formen. (Kurdjian et Le Goff 1966, Rubio-Huertos et al. 1972).

Solche Virulenzverluste bedeuten keinerlei Verlust :

der Eigenschaften, die auf dem Plasmid lokalisiert sind. (Beiderbeck 1976).

Andere Virulenzverluste erklären sich aus Plasmidverlust, und sind mit gleichzeitigem Verlust der mit der Virulenz gekoppelten Eigenschaften verbunden.

Zum Beispiel verlieren manche *A. tumefaciens*-Stämme ihre Virulenz, wenn sie bei hoher Temperatur wachsen.

(bei 37°C) (Hamilton and Fall 1971). Zugleich geht ihr TI-Plasmid verloren. (Kado 1975). Mit dem Plasmid verlieren die Bakterien folgende Eigenschaften:

a) die Fähigkeit zum Abbau von Octopin und/oder Nopalalin.

b) Fähigkeit zum Ausschluß des Phagen AP1.

c) Empfindlichkeit für Agrocin 84. (Bomhof et al. 1976, Schell 1975).

Solche avirulent gewordenen "Mutanten" des *A. tumefaciens* können an Hand ihrer Resistenz gegen Agrocin 84 leicht identifiziert und isoliert werden. (Engler et al. 1975).

Auf der anderen Seite bedeutet die Übertragung des Plasmids von virulenten Stämmen auf avirulente Stämme die Einführung der Virulenz und gleichzeitigen Gewinn der genannten Eigenschaften. (N. Van Larebeke 1975, Kerr 1977).

Versuche zur Übertragung der Virulenz bzw. des Plasmids wurden sowohl in planta (Kerr 1969, Roberts and Kerr 1974, Van Larebeke et al. 1975, Albinger und Beiderbeck 1977). als auch in vitro (Genetello et al. 1977, Kerr 1977) mit Erfolg durchgeführt. In vitro ist eine Plasmidübertragung auf drei verschiedene Weisen möglich:

1) Durch Konjugation zwischen einem Donor-Stamm, der neben dem TI-Plasmid noch ein Plasmid vom P-Typ (RP4) besitzt, und einem avirulenten, rezipienten Stamm.

Unter Cotransfer wird das TI-Plasmid auf den Rezipienten übertragen. (Bomhof et al. 1976, P.J.J. Hooykaas 1979<sub>b</sub>).

2) In Gegenwart hoher Konzentrationen von Octopin findet direkte Konjugation zwischen Donor und Rezipient statt. (Genetello et al. 1977, Kerr et al. 1977).

3) Gereinigte Plasmid-DNS eines Donor-Stammes wird zur Transformation des Rezipienten-Stammes verwendet. (Schell et al. 1976).

Unter Bedingungen, die für eine Tumorinduktion günstig sind, konnte ein Übertritt von Radioaktivität aus *A. tumefaciens*, dessen DNS mit Hilfe von <sup>3</sup>H-TdR radioaktiv gemacht worden war, in Scheiben von *Daucus carota* festgestellt werden. (Yajko and Hegeman 1971)

Dazu wurden Teile der Plasmiden-DNS in Tumorzellen wiedergefunden. Untersuchungen zeigten, daß ca. 20 Kopien einer DNS-Sequenz von ca.  $3,7 \times 10^6$  Daltons in einer diploiden Tumorzelle vorhanden sind; das entspricht 0,0013 % der Tumor-DNS. (Nester et al. 1976) Diese Befunde und die Tatsache, daß viele virulente *A. tumefaciens*-Stämme ein übertragbares Plasmid besitzen, unterstützen sich gegenseitig und machen die Annahme sinnvoll, daß während der Transformation einer Normalzelle zur Tumorzelle eine Übertragung des genetischen Materials zwischen Agrobakterien und der Pflanzenzelle in Richtung Pflanzenzelle erfolgt.

Alle diesen Kenntnisse über Agrobakterium gehen im wesentlichen auf Untersuchungen an *A. tumefaciens* zurück. Der nahe verwandte Haar-Wurzel (=Hairy-Root)-Erreger *A. rhizogenes* blieb verhältnismäßig unerforscht.

#### A. Rhizogenes:

Als man in den USA an den Stämmen von Apfelbäumen auf dem Wurzelhals lokalisierte, verholzte Anomalien, sog. Hairy-Roots, bemerkte, glaubte man, auch diese Krankheit sei von *A. tumefaciens* verursacht. Nach Untersuchungen von Riker, Banfield, Wright, Keitt und Sagen (1930) wurde klar, daß der Erreger dieser Krank-

heit dem *A. tumefaciens* ähnlich aber nicht mit ihm identisch ist. (Riker 1930). Sein erster Name war *Phytomonas rhizogenes*. Heute wird er *Agrobacterium rhizogenes* genannt. (Conn 1942).

Dieses Bakterium ist wie *A. tumefaciens* stäbchenförmig, gram-negativ, aerob und nicht säurefest. Es bewegt sich durch 1-2 Geißeln, bildet eine Kapsel und hat eine Größe von 1,44 X 0,43  $\mu$ m. (Appel, O. und H. Richter. 1956).

Das Bakterium verursacht langsam wachsende, reichlich bewurzelte Proliferationen an Rosazeen und anderen Pflanzen. (Riker et al. 1930, Beiderbeck und Müller, 1974). Weitere Eigenschaften werden in anderen Teilen meiner Arbeit erwähnt.

#### c) PROBLEME DER ARBEIT:

*A. rhizogenes* 15834 hat wie *A. tumefaciens* ein Plasmid. (Schell, J., Montagu van M. et al. 1976), und es konnte deutlich gemacht werden, daß dieses Plasmid auf einen avirulenten *A. tumefaciens* übertragbar ist (Albinger und Beiderbeck 1977) und diesem die Fähigkeit zur Wurzelinduktion vermittelt.

Es blieben aber folgende Fragen offen, die ich zu erklären versuchte:

- 1) Ist an besonderer Virulenz von *A. rhizogenes* nur das Plasmid beteiligt?
- 2) Liegen genetische Informationen zur Wurzelinduktion nur auf dem Plasmid?; oder hat auch das Chromosom des *A. rhizogenes* einen Einfluß auf diese Eigenschaft?.
- 3) Ist ein wurzelinduzierendes Bakterium in ein tumorinduzierendes Bakterium zu verwandeln? Wie würden biologische und biochemische Eigenschaften eines solchen Bakteriums aussehen?

Um diese Fragen zu erklären, waren folgende experimentellen Schritte zu tun:

- 1) Avirulente Mutanten von *A. rhizogenes* 15834 waren zu erzielen;
- 2) Avirulente *A. rhizogenes* 15834 waren auf ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften hin zu untersuchen;
- 3) Plasmidübertragungsversuche waren durchzuführen und dabei der avirulente *A. rhizogenes* 15834 als Rezipient zu verwenden;
- 4) Die Bedingungen waren zu ermitteln, die größten Gewinn von Transkonjuganten ermöglichen.

Jeder dieser Teilschritte war verbunden mit ausführlichen Virulenztests, die jeweils 4 Wochen dauern

und das größte Handicap für rasche Untersuchungen darstellen.

MATERIAL UND METHODEN:1) BAKTERIEN:

Folgende Bakterien-Stämme wurden in unseren Versuchen verwendet:

A. RHIZOGENES, STAMM 15834: (Herkunft: J.A. Lippincott, Evanston, USA), induziert nach Wundinfektion Wurzelbildung an Blättern und Sprossen von *Kalanchoe daigremontiana*. Er wächst in Nährbrühe (Lippincott and Heberlein 1965) (NB) homogen, und einer Extinktion von 0,1 bei 660 nm im Spectronic 20 (Bausch & Lomb.) entsprechen  $1,34 \times 10^8$  koloniebildende Bakterien. (Beiderbeck, 1972). Dieses Bakterium ist unempfindlich für den Agrobakterium-Phagen PS8. (Herkunft: G.T. Heberlein, St. Luis, USA).

A. TUMEFACIENS, STAMM B6-806: (Herkunft: J.A. Lippincott, Evanston, USA), induziert nach Wundinfektion unorganisierte Tumoren an *Kalanchoe daigremontiana*. In Nährbrühe (NB) in Schüttelbadkultur wächst er klumpig, und einer Extinktion von 0,1 bei 660 nm entsprechen ca.  $2 \times 10^8$  koloniebildende Bakterien pro ml. Phage PS8 ist virulent für dieses Bakterium.

A. RADIOBACTER, STAMM 84: (Herkunft: A. Kerr, Glen Osmond, Australia), avirulent, produziert Agrocin 84

...

und ist unempfindlich für den Phagen PS8. Dieses Bakterium wächst in NB klumpig.

## 2) MEDIEN:

### a) NÄHRBRÜHE:(NB) (LIPPINCOTT UND HEBERLEIN 1965)

Dieses Medium ist ein Vollmedium und eignet sich als ein gutes Medium für alle Agrobacterium-Stämme, mit denen ich experimentiert habe.

#### Zusammensetzung des Mediums:(g pro Liter)

Hefe-Extrakt(Difco)	1,0 g.
Saccharose	5,0 g.
Beef-Extrakt(Difco)	3,0 g.
Bacto-Peptide	5,0. g.

In manchen Versuchen habe ich dieses Medium 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.(NB/10).

Wenn ich ein festes Medium herstellen wollte, habe ich einem Liter Nährbrühe(NB) 15 g. Agar zugesetzt. Das Medium hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von  $\text{pH} = 6,9 \pm 0,1$  und ist ca. 1 Jahr haltbar.

Für den Test zur Isolierung der Antibiotika-Resistenten Bakterien wurde dem NB/10 2 % Agar zugefügt.

b) BASALMEDIUM NACH STONIER: (1960)

Dieses vollsynthetische Medium erwies sich für den Agrocin-84 Test besonders nützlich und wurde von mir mit einigen Änderungen, wie von Albinger (1976) vorgeschlagen, übernommen. *A. radiobacter* 84 wächst zwar in diesem Medium nicht optimal, aber sein Wachstum ist für unseren Zweck zufriedenstellend gewesen.

Zusammensetzung des Mediums: ( in 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.)

CasO <sub>4</sub>	0,1	g.
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g.
NaCl	0,2	g.
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,7	g.
FeCl <sub>3</sub>	3,35	mg.
MnCl <sub>2</sub>	0,1	mg.
ZnSO <sub>4</sub>	0,6	mg.
K-Citrat	10,0	g.
Na-Glutamat	2,0	g.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3	g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,88	g.

Dieses Medium hat einen pH-Wert von pH= 6,9.

PUFFER-AGAR (Stonier 1960)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8	g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	8,9	g.
Agar	7,0	g.

Wenn dieser Puffer-Agar mehr als zweimal autoklaviert wird, bekommt er eine mehr oder weniger bräunliche Farbe. Deshalb empfiehlt es sich nicht, diesen Puffer-Agar in großen Mengen herzustellen. Sein pH-Wert ist pH= 7,0.

c) BASALMEDIUM NACH KERR(1977):

Kerr hat dieses Medium zur in vitro Plasmid-Übertragung bei Agrobakterien verwendet. Ich habe in allen meinen Versuchen dieses Medium als Grund-Medium für Experimente zur Plasmid-Übertragung genommen und mit verschiedenen Stoffen kombiniert. Dabei wurden diesem Medium jedesmal Vitamine(nach Lippincott - 1973) zugesetzt.

Zusammensetzung des Mediums:(in 1000 ml H<sub>2</sub>O Lsg.)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,5	g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5	g.
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g.
CaCl <sub>2</sub>	10,0	mg.
FeSO <sub>4</sub>	5,0	mg.
MnCl <sub>2</sub>	2,0	mg.
Biotin	10,0	mg.
Calcium Pantothenat	10,0	mg.
Nicotinsäure	10,0	mg.
Glutamat	1,0	g.

Als festes Medium enthält es zusätzlich 2 % Agar. Es ist autoklavierbar und hat einen pH-Wert von  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,05$ .

In allen Versuchen, bei denen ich mit Flüssigmedium arbeitete, wurde ohne Begasung des Mediums gearbeitet. Sowohl die Anreicherung der einzelnen Bakterien-Stämme in verschiedenen Flüssigmedien als auch die Bebrütung der verschiedenen Bakterien-Gemische in flüssigen Medien unterschiedlicher Zusammensetzung wurden entweder im Schüttelbad oder stehend im Brutschrank durchgeführt.

### 3) TESTS:

Folgende Tests wurden zur Identifizierung der Bakterien-Stämme verwendet:

#### a) PRODUKTION VON KETOLACTOSE: (BERNAERTS UND DE LEY 1967)

Liegt Lactose in einem Medium als Haupt-Kohlenstoff-Quelle vor, kann sie von verschiedenen Stämmen der Art *A. tumefaciens* metabolisiert werden. Dabei wird die Hydroxyl-Gruppe am C<sub>3</sub>-Atom des Glucoseanteils zur Carbonyl-Gruppe oxydiert. (Albinger 1976). Andere Agrobakteriumsstämmen sind zu dieser Umwandlung nicht in der Lage.

Bei Durchführung dieses Tests habe ich zu prüfende Bakterien entweder mit Impföse oder mit Impfnadel zentral auf Test-Agar aufgetragen. Nach zwei bis dreitägigem Wachstum läßt sich prüfen, ob Ketolactose gebildet worden ist oder nicht. Für diesen Nachweis verwendet man Benedicts-Reagens, von dem 15-20 ml auf Test-Agar gegossen wird. Wurde durch einen Stamm Ketolactose gebildet, zeigt sich dann nach ungefähr 30 min eine durch Kupfer-I-Oxyd (Cu<sub>2</sub>O) gelb gefärbte Zone um die Brutstelle, die zuerst 3-5 mm breit ist und sich mit der Zeit (z.B. in 1,5 Std.) ausbreitet.

Test-Agar zur Bebrütung der Bakterien:

Lactose	10 g.
Hefe-Extrakt(Difco)	1 g.
Agar	20 g.
H <sub>2</sub> O dem.	1000 ml.

pH-Wert dieses Mediums ist pH= 6,8. Das Medium ist autoklavierbar.

BENEDICTS-REAGENS:

Es werden;

- 1) 17,3 g. CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O in 150 ml H<sub>2</sub>O ;
- 2) 100 g. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 173 g. Na-Citrat in 700 ml H<sub>2</sub>O getrennt gelöst. Dann werden beide Lösungen vermischt und mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt. Das Reagens ist für längere Zeit haltbar.

b) LACKMUSMILCH REAKTION: (LIPPINCOTT UND LIPPINCOTT 1969)

Lackmusmilch ist ein Komplexmedium, das aus natürlichen und künstlichen Stoffen zusammengesetzt ist. In diesem Medium wachsen alle Bakterien-Stämme und rufen nach bestimmter Inkubationszeit je nach Bakterien-Stamm unterschiedliche Farbreaktionen und andere Reaktionen in Testgefäßen hervor. (Nach 3 Wochen).

Die Lackmusmilch (Difco-Bacto-Litmusmilch, dehydrated) wird in Reagenzgläser gefüllt (10 ml in je Glas), und autoklaviert. Von zu testenden Bakterien werden aus einer zwei Tage alten Kultur-Suspension 0,2 ml in die Lackmusmilch gegeben. Man läßt dann die Reagenzgläser im Brutschrank bei 27°C stehen. Die Farbzonen und andere Merkmale werden nach 3 Wochen registriert.

c) WACHSTUM BEI 35°C:

0,1 ml Bakterien aus einer zwei Tage alten Kultur-Suspension werden zu 20-30 ml flüssigem NB-Medium gegeben und im Schüttelbad bei 35°C inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen werden jeweils 4 ml Probe entnommen und Extinktion bei 660 nm gemessen.

d) OCTOPINABBAU TEST: (LIPPINCOTT AND BEIDERBECK 1973)

Da *A. rhizogenes* 15834 Vitamin-Zusatz braucht (Lippincott und Beiderbeck 1973), habe ich den Octopinabbau aller verwendeten Stämme in einem mit Vitaminen ergänzten Medium 'S' (Monod 1946) getestet. Es wurden 0,1 ml einer zwei Tage alten Bakterien-Kultursuspension mit 5 ml M+V+O (Monod's 'S' Medium + Vitamine + Octopin) versehen und im Schüttelbad bei möglichst großer Medienoberfläche geschüttelt. Nach vier Tagen

Wachstum wurde der Inhalt der Reagenzgläser abzentrifugiert, die Überstände in saubere Gläser gefüllt. Auf 1 ml Überstand wird 1 ml 4 % ige NaOH aufgefüllt, beide gut gemischt und dann mit 1 ml Diacetyl-Reagens vermischt. (Diacetyl-Reagens = 3 % -Naphtol und 0,015 % Diacetyl in 60 % igem n-Propanol). Bei Gegenwart von Octopin (bzw. freier Guanidin-Gruppen) entsteht in 30 min eine rote Farbe und bleibt 2-3 Std. ohne jede Farbänderung. Die Farb-Extinktion wurde bei 530 nm im Photometer gemessen.

MONOD'S "S" MEDIUM: (in 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,45	g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,55	g.
NH <sub>4</sub> Cl	1,0	g.
CaCl <sub>2</sub>	0,01	g.
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1	g.
FeSO <sub>4</sub>	0,5	mg.
Glucose	2,0	g.
Octopin	0,05	g.

Im Original enthält das Medium kein Octopin, hat einen pH-Wert von pH= 6,9. Zu diesem Medium angesetzte Vitamine sind bei 'Basalmedium nach Kerr' angegeben. Das Medium ist autoklavierbar. (s.S. 23 )

e) AUSBREITUNG DER BAKTERIEN AUF WEICHAGAR: (BEIDER-  
BECK 1979)

In einem verdünnten, nährstoffarmen und sehr weichen Agar-Medium breiten sich Agrobakterien chemotaktisch je nach Stamm mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit aus. Manche Stämme legen in 24 Std. mehrere Zentimeter zurück, während manche sich nicht von der Stelle rühren. (Beiderbeck, 1979).

Diesen Test habe ich in den Versuchen verwendet, in denen ich;

a) Agrocin 84-resistente Kolonien von *A. rhizogenes* 15834;

b) Transkonjuganten nach Übertragung der Virulenz auf *A. rhizogenes* zu identifizieren versuchte.

Da *A. rhizogenes* 15834 Vitamin-Zusatz braucht (Beiderbeck, 1979), habe ich Monod's 'S' Medium ohne Glukose aber mit Vitamin-Zusatz hergestellt und 1:20 mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt. Dem Medium wurden später 20 mg Glucose und 0,17 % Agar zugesetzt. Von einer flüssigen Kultur-Suspension jeweiliger Bakterien-Art wurde ein kleiner Tropfen auf die Mitte der Weichagarplatte getropft. (0,5-1 cm Ø). Die Petrischalen wurden in den Brutschrank gestellt und bebrütet. In be-

stimmten Zeitabständen wurden die Durchmesser der bakteriendurchsetzten Zonen gemessen.

f) SIMMON'S CITRAT TEST:(SIMMONS 1926)

Citrat wird von vielen Bakterien-Stämme verwertet. Dabei erfolgt eine Änderung des pH-Wertes des Mediums. Diese Änderung kann z.B. mit Hilfe von Bromthymolblau(BTB) sichtbar gemacht werden. Bromthymolblau hat bei pH-Werten bis pH= 6,0 eine gelbe., ab pH= 7,6 eine blaue und zwischen diesen pH-Werten eine grünliche Farbe.(E.T.Cetin, 1968).

Bakterien wurden entweder mit der Impföse aus Flüssigkultur oder mit der Impfnadel von Festkultur auf das Medium aufgetragen. Nach zwei Tagen zeigte sich dann Gelb-, bzw. Blaufarbumschlag des BTB.

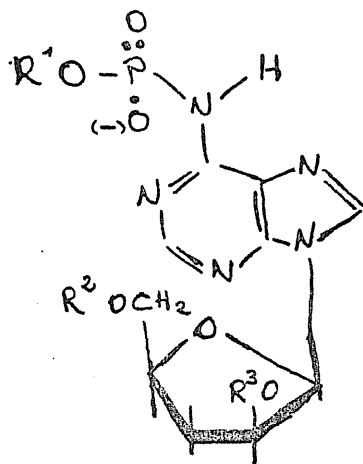
Zusammensetzung des Mediums:(in 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.)

Hefe-Extrakt(Difco)	0,0005 %	
NaCl	5,0	g.
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g.
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	g.
Na-Citrat	2,0	g.
Agar	20,0	g.

Zu 1 Liter Medium werden 10 ml einer 1,5 % igen Alkohol-BTB-Lösung zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums beträgt  $\text{pH} = 6,8$  ; die nach der BTB-Zugabe entstehende Farbe ist olivgrün. Danach wird das Medium autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Eine Aufbewahrung des Mediums über längere Zeit empfiehlt sich nicht.

g) EMPFINDLICHKEIT FÜR AGROCIN 84: (Nach Stonier 1960).

Agrocin 84 ist ein ungewöhnliches Antibiotikum, das von *A. radiobacter* 84 produziert wird und auf viele pathogene Agrobakterien selektiv wirksam ist. (Kerr, A. 1980, Roberts, W.P., Tate, M.E. 1977). Es ist ein 6-N-Phosphoramidat eines Adenin-Nucleotids und gehört zu den sog. Nucleotid-Bacteriocinen. (Kerr, A. 1980). Gereinigtes Agrocin 84 enthält Adenine, Phosphor, 3'-deoxy-D-Arabinose und D-Glucose im Molekularverhältnis von 1:2:1:1. (Roberts, W.P. et al 1977).



Agrocin 84  
(Kerr, A. 1980)

Bei avirulenten Agrobakterien zeigt dieses Antibiotikum in der Regel keine Wirkung.

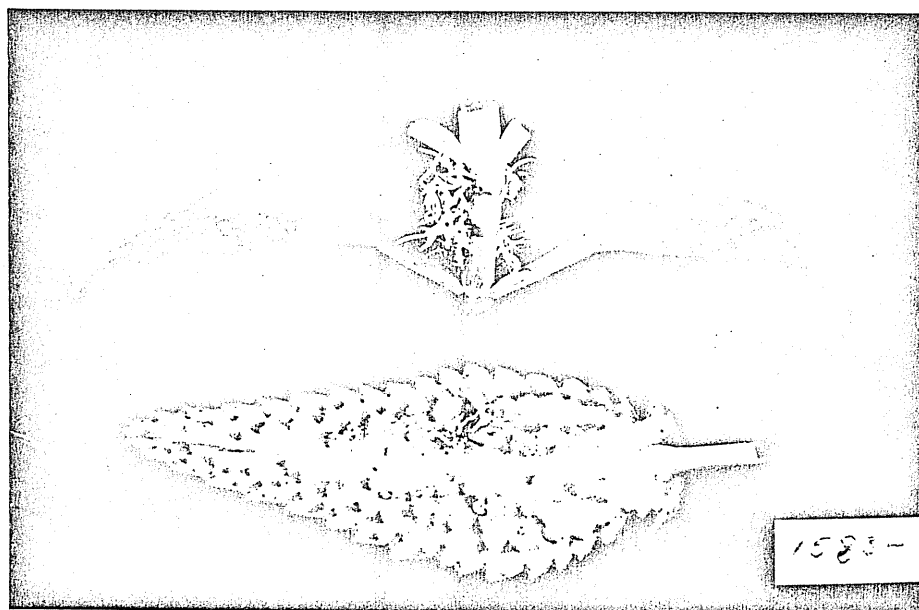
Mit Hilfe von Agrocin 84 erzielt man bei vielen virulenten *A. tumefaciens*-Stämmen sehr einfach die Isolierung von avirulenten Mutanten aus einer Bakterienpopulation. (Engler et al. 1975). Bei Durchführung dieses Tests mit *A. rhizogenes* 15834 habe ich wegen

schlechten Wachstums dieses Stammes auf dem Basalmedium nach Stonier(1960) keine guten Resultate bekommen können. Auf diesem Medium läßt sich der Test mit *A. tumefaciens* Stamm C58 einwandfrei durchführen, und es lassen sich avirulente Kolonien isolieren.(Engler et al. 1975). Schließlich habe ich darauf verzichtet, dieses Medium als Bebrütungsmedium für den eigentlichen Test zu verwenden und stattdessen NB + 1 % Agar genommen. Die zugrundeliegende Technik des Versuches blieb aber wie bei Stonier 1960 beschrieben.(s.S. 22 ).

#### h) VIRULENZ-TEST AN KALANCHOE DAIGREMONTIANA:

Dieser Test wurde mit einem Impfigel an Blättern von *K. daigremontiana* durchgeführt. Dabei wurden Bakteriensuspensionen auf die verwundeten Blätter aufgetragen.(Beiderbeck 1970). In späteren Versuchen wurden die Bakterien mit Hilfe eines Zahnstochers vom festem Medium direkt auf die durch gleichzeitige Verwundung entstandene Wunde aufgetragen. Nach vier Wochen wurde die Zahl der auf den Blättern entstandenen Tumoren bzw. Wurzeln registriert. Bei einer Infektion von *K. daigremontiana* mit *A. tumefaciens* Stamm B6-806 braucht man nicht länger als drei Wochen zu warten, weil das endgültige Tumorverhältnis in dieser Zeit deutlich wird. Bei Infektion mit

*A. rhizogenes* 15834 darf das endgültige Ergebnis erst nach vier Wochen registriert werden, da die Wurzelanlagen und Wurzeln vom 19-25 Tag nach der Infektion größer und zahlreicher werden. (Beiderbeck 1974).



Durch *A. rhizogenes* 15834 hervorgerufene Wurzelinduktion an einem Kalanchoe-Blatt und -Spross.

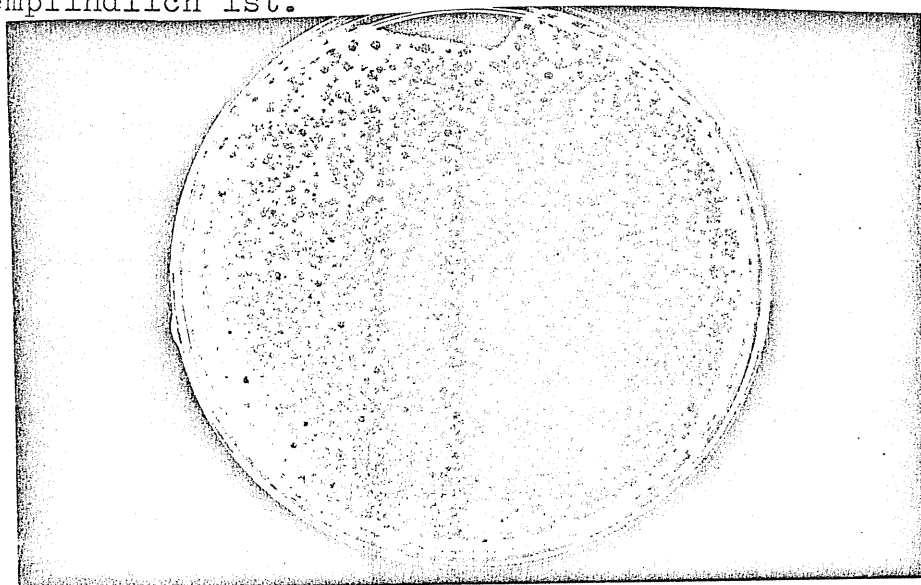
( 6 Wochen alt)

i) PHAGEN TEST MIT PHAGE PS8:

Der DNS-Phage PS8 ist virulent für verschiedene Derivate des Stammes B6 von *A. tumefaciens*. (Beiderbeck, 1977). Der Stamm B6-806 ist gegen diesen Phagen empfindlich, *A. rhizogenes* 15834 dagegen nicht.

Ich habe diesen Phagen verwendet, um beide Stämme von-

einander zu unterscheiden. Der Test wurde nach der Methode von Adams(1959) durchgeführt. Dabei werden Phagen in einem günstigen Titer mit zu prüfender Bakteriensuspension in Weichagar(0,7 % Agar) gemischt und auf ein festeres Medium(1,5 % Agar) plattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 27°C sind die Plaques mit *A. tumefaciens* B6-806 auf dem Medium zu sehen. *A. rhizogenes* 15834 wächst innerhalb dieser Zeit gut und ohne Plaques, weil dieser Stamm gegen Phagen PS8 unempfindlich ist.

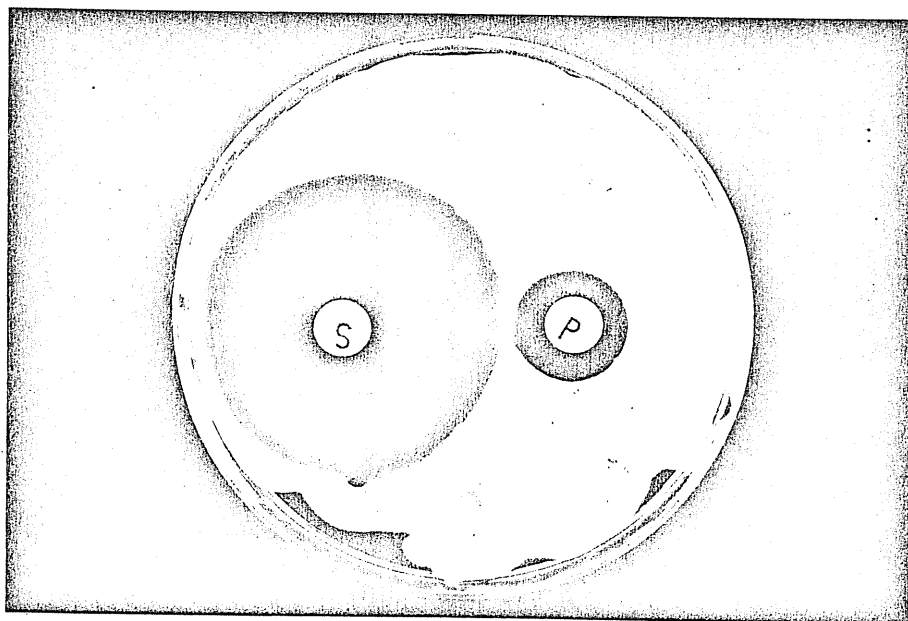


Durch Phagen PS8 erzeugte Plaques auf der Platte mit *A. tumefaciens* B6-806.(2. Tag).

Der Phage PS8 läßt sich in Flüssigmedium(NB) gemischt mit *A. tumefaciens* B6-806 über Nacht in hohem Titer erhalten.(etwa  $10^8$  -  $10^9$  Phagenpartikel pro ml).

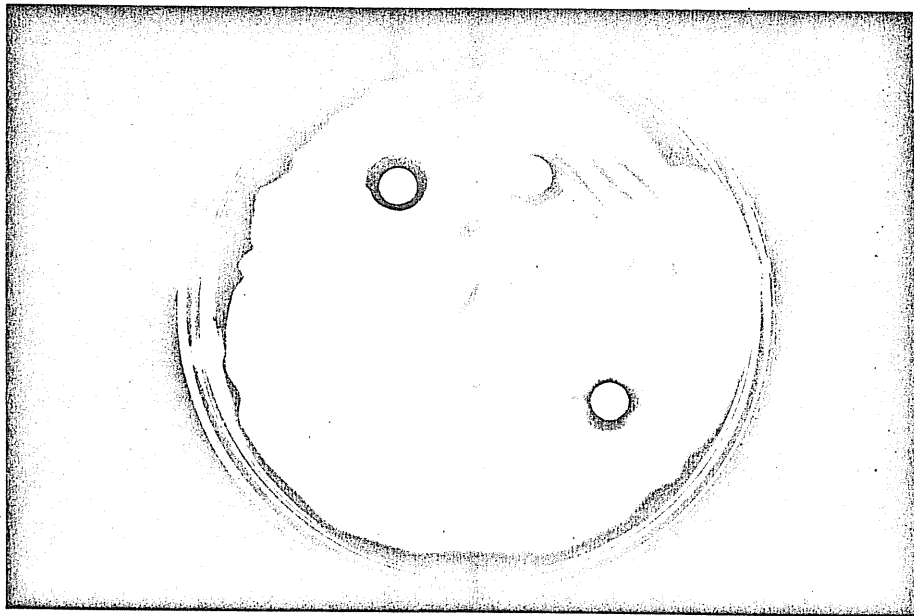
k) WACHSTUM AUF 1000 ug/ml STREPTOMYCIN UND 3 ug/ml GENTAMYCIN:

Dieser Test wurde zur Vorbereitung der Konjugationsversuche verwendet. Zunächst wurden die Bakterien, unter denen ich die antibiotika-resistente Mutante auffindig machen wollte, auf ein Medium (NB/10 mit 2 % Agar) mit 1000 ug/ml Streptomycin plattiert. Resistente Kolonien wurden isoliert, auf Virulenz geprüft und wiederum auf NB/10 (mit 2 % Agar) mit 3 ug/ml Gentamycin plattiert. Die hier gewonnenen resistenten Kolonien erwiesen sich dann bei gleichzeitiger Gegenwart beider Antibiotika als resistent. In Gegenwart dieser Antibiotika sind die Kolonien resistenter Bakterien erst nach drei Tage auszuwählen.

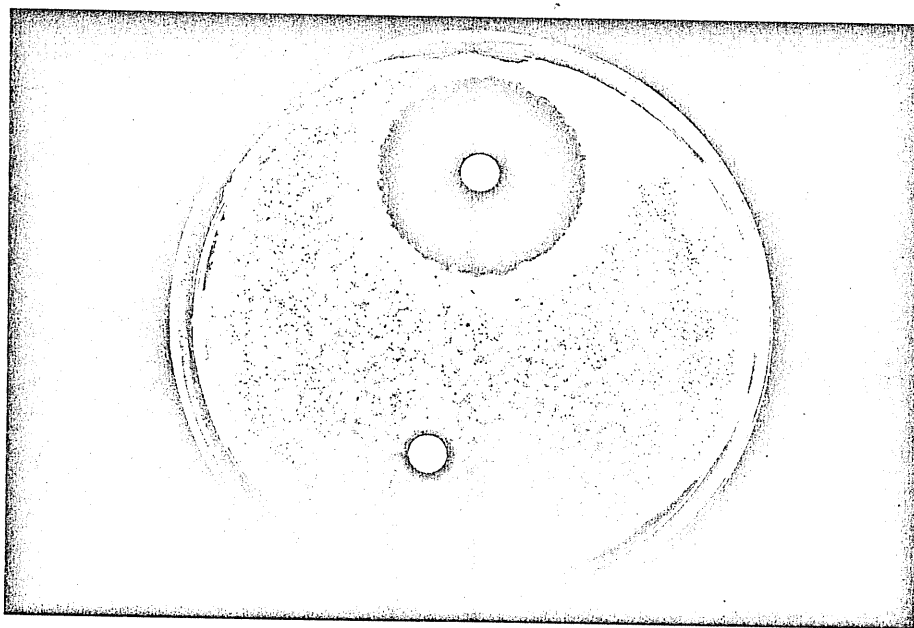


Empfindlichkeit von *A. rhizogenes* 15834 gegen  
1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin.

S= Streptomycin, P= Gentamycin.



Resistenz von 3Co3 gegen Streptomycin bzw. Gentamycin.

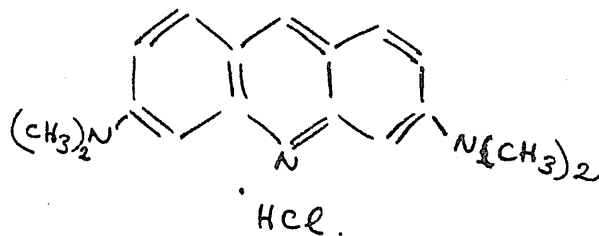


Empfindlichkeit von *A. tumefaciens* B6-806 gegen Streptomycin und Gentamycin.

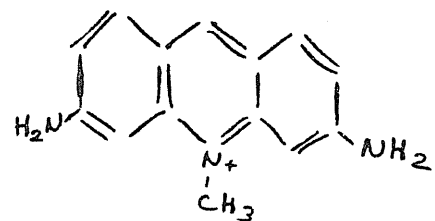
#### 4) SPEZIELLE METHODEN:

##### a) KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN IN GEGENWART VON ACRIDINORANGE BZW. ACRIFLAVIN:

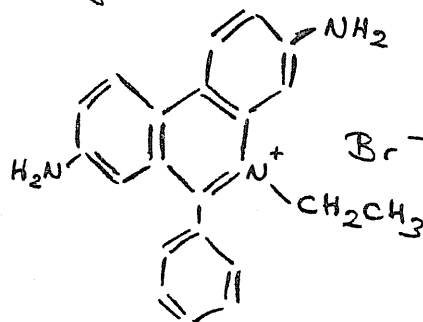
Acridine sind Farbstoffe, die bei der Nucleinsäure-Färbung verwendet werden. (E. Jawetz, J.L. Melnick und E.A. Adelberg 1977). Sie verursachen aber bei entsprechenden Konzentrationen Mutationen, die oft zum Verlust der F-Faktoren in der Zelle (z.B. von E. coli) führen. (Hirota, Y. 1960).



Acridinorange.



Acriflavin.



Ethidiumbromid.

Ich wollte aus diesem Grund mit zwei Acridinen, nämlich mit Acridinorange und Acriflavin experimentieren, um eine Plasmid-Eliminierung bei A. rhizogenes 15834 zu erzielen.

Acridinorange wurde zuerst in dest. H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 500 ug/ml gelöst und autoklaviert. Diese Stammlösung ist im Dunkeln eine Woche lang haltbar. (Hirota 1960).

In Test-kolben(100 ml) wurden 25 ml Nährbrühe(NB) gefüllt, unterschiedliche Mengen von AO.(Acridinorange) zugegeben und vermischt.(Verdünnungsreihe). Jeder Stufe dieser Verdünnungsreihe wurden 0,2 ml einer 48 h. alten NB-Kultur von *A. rhizogenes* 15834 zugegeben. Anschließend wurden die Kolben im Schüttelbad bei 28°C inkubiert. pH-Wert des Mediums wurde von pH= 7,4-8 variiert.

Verdünnungsreihe mit AO.

0-	0	ug/ml	Acridinorange.(Kontrolle)
1-	1	ug/ml	"
2-	3	ug/ml	"
3-	5	ug/ml	"
4-	10	ug/ml	"
5-	15	ug/ml	"
6-	20	ug/ml	"
7-	25	ug/ml	"

Mit einer Probe bei 25 ug/ml AO.-Konzentration wurde die Ausgangstrübung (OD<sub>660</sub>) des Mediums(mit Bakterien) bei 660 nm gemessen.

Diesen Versuch habe ich einmal mit variierten pH-Werten von pH= 7,4-8 und fünfmal bei pH= 7,6 durchgeführt. Nach 48 stündiger Inkubation im Schüttelbad wurde die Suspensionsdichte jeder Suspension bei 660 nm gemessen und die Bakterien anschließend bei 4000 U/min 30 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Bakterien mit Tris-Puffer(0,0025 M Tris,  $10^{-4}$  M  $MgSO_4$ , pH=8) auf eine Extinktion von 0,1 verdünnt und auf Virulenz an je drei Kalanchoe-Pflanzen geprüft.

Analog wurde mit Acriflavin verfahren. Da Acriflavin auf Bakterien toxischer wirkt, habe ich mit Acriflavin-Konzentrationen von 0-10 ug/ml gearbeitet. (Hirota 1960). Bakterien wurden vier Tage lang bei 28°C inkubiert dann aus jeder Konzentration 0,1 ml auf NB + Agar plattiert, für drei Tage bei 27°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden unter den lebenden Kolonien bis 97 Kolonien/Ansatz ausgewählt und erneut auf NB + Agar ausgestrichen. Außerdem wurden die Bakterien an Kalanchoe auf ihre Virulenz geprüft.

b) KULTIVIERUNG DER MIT UV BEHANDELTEN BAKTERIEN IN GEGENWART VON ACRIDINORANGE BZW. ACRIFLAVIN:

Wenn Shigella-Bakterien vor einer Acridin-Behandlung mit UV bestrahlt werden, wird die Zahl der Bakterien, deren Plasmide durch Acridine eliminiert werden, erhöht. (Watanabe, T. 1961). Ich habe diese Methode auch mit *A. rhizogenes* 15834 ausprobiert. 5 ml einer Bakteriensuspension, die  $1,7 \times 10^9$  Bakterien pro ml enthält, wurden unter ständigem Rühren aus einer Entfernung von 20 cm 10 Sekunden lang mit UV bestrahlt. Nach dieser Bestrahlung bleiben bei *A. tumefaciens* Stamm B6 10 % der Bakterien am Leben. (Beiderbeck pers. Mittlg.). Im Anschluß an die Bestrahlung wurden Bakteriensuspensionen im Dunkeln bei 27°C vier Stunden inkubiert und dann mit Acridinorange-, bzw. Acriflavinlösungen (0-10 ug/ml) in flüssigem NB-Medium inkubiert. (bei pH= 7,6).

Nach fünf-tägiger Inkubation wurden;

a) von den Kultursuspensionen mit 4 ug/ml Acriflavin, 5 ug/ml Acriflavin, 10 ug/ml Acriflavin und 10 ug/ml Acridinorange jeweils 0,1 ml direkt auf NB-mit 1,5 % Agar plattiert.

b) die übrigen Bakterienkulturen nach  $10^3$ -facher Verdünnung auf NB + Agar plattiert.

Nach zwei Tagen war auf den Petrischalen mit in 10 ug/ml AO. und in 10 ug/ml Acriflavin behandelten Bakterien keine Kolonienbildung zu sehen, während auf anderen Platten gutes Wachstum mit vielen Kolonien zustande gekommen war.

Von jeder Platte wurden 10 Kolonien (von der mit 4 ug/ml Acriflavin nur zwei Kolonien) ausgewählt und wiederum auf NB + Agar aufgetragen. Am zweiten Tag wurden die Pflanzen mit diesen Kolonien infiziert. Gleichzeitig wurden Bakterien aus diesen Kolonien in Monod's 'S' Medium + Vitamine + Octopin geimpft und auf ihre Fähigkeit zum Octopinabbau geprüft.

c) VERSUCHE ZUR ELIMINIERUNG DES PLASMIDS VON A. RHIZOGENES 15834 DURCH KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN IN GEGENWART VON ETHIDIUMBROMID:

Slonimski, P.P.(1968) hat gezeigt, daß bei Hefen durch Interkalieren von EBr.(Ethidiumbromid) zwischen die Basen der Mitochondrien-DNS Organellmutationen bewirkt werden. Dieser Farbstoff ändert die Superhelixstruktur der DNS und verursacht damit in ihrer Funktion gestörte Mitochondrien-DNS und in der Folge Mutanten der Hefe, die nicht mehr die ursprüngliche Wachstumsrate zeigen. Darüberhinaus wurde nachgewie-

sen, daß diese Wirkung von EBr. mit der von Acridine identisch und sogar größer als die von Acridinen ist. (Slonimski 1969). Später haben Bor-Chian und C.I.Kado (1977) nachgewiesen, daß durch die Kultivierung von virulenten *A. tumefaciens* Stamm C58 in Gegenwart von EBr. avirulente Mutanten in einer Bakterienpopulation produziert werden können.

Ich habe die Wirkung dieses Farbstoffs auf die Virulenz von *A. rhizogenes* 15834 geprüft.

Ausgehend von einer 1/10 mM EBr.-Lösung in dest. H<sub>2</sub>O wurde unter sterilen Bedingungen eine Verdünnungsreihe mit steriler NB hergestellt. (0-1 uM EBr.). Die so entstandenen Medien (je 20 ml) wurden dann mit 0,2 ml einer 48 h -Kultur von *A. rhizogenes* 15834 inokuliert, (Ausgangskonz. 10<sup>7</sup> Bakt./ml), und 48 Std. im Schüttelbad bei 28°C bebrütet. Anschließend wurden die Kultursuspensionen bei 4000 U/min abzentrifugiert, die Bakterien mit Tris-Puffer (0,0025 M Tris, 10<sup>-4</sup> M MgSO<sub>4</sub> und pH= 8) suspendiert und mit diesen Ssupensionen der Test auf Virulenz an Kalanchoe-Pflanzen (Igel-Test) durchgeführt. Die Experimente wurden mit höheren EBr.-Konzentrationen (0-100 uM EBr.) und längerer Inkubationszeit wiederholt und erweitert.

Außerdem wurde der Versuch mit sehr geringer Ausgangs-

konzentration von Bakterien (100 Bakt./ml) wiederholt. Ein Teil der Bakterien wurde nach 3- bzw. 6-tägiger Inkubation mit EBr. auf NB + Agar plattiert. Nachdem auf dem NB + Agar Kolonien gewachsen waren, wurden von jeder Platte bis zu 16 Kolonien zufällig ausgewählt und auf ihre Virulenz an Kalanchoe geprüft.

d) VERSUCHE ZUR SELEKTION VON AVIRULENTEMUTANTEN VON A. RHIZOGENES 15834 AUF GRUND IHRER RESISTENZ GEGEN AGROCIN 84 AUS A. RADIOBACTER 84:

Agrocin 84 ist ein Nucleotid-Antibiotikum, das vom avirulenten, saprophyten *A. radiobacter* 84 produziert wird. Viele virulenten Stämme von *A. tumefaciens* sind für diese Substanz empfindlich und diese Empfindlichkeit ist auf dem gleichen Plasmid lokalisiert wie die Virulenz. (Engler et al. 1975, Kerr, A. 1975, Kerr and Htai 1974, Roberts and Kerr 1974). Isoliert man aus einer Population von *A. tumefaciens* Stamm C58 Resistente gegen dieses Antibiotikum, so sind alle avirulent. (Engler et al. 1975). Verlust des Plasmids hat dabei Virulenz und Agrocin-Empfindlichkeit verschwinden lassen. Daher bietet dieses Antibiotikum ein schnelles Verfahren, avirulente Mutanten einer *A. tumefaciens* Stamm C58-Population zu isolieren.

Albinger(1976) hat gezeigt, daß das nahe verwandte *A. rhizogenes* für Agrocin 84 empfindlich ist. Auf der Suche nach avirulenten Mutanten des *A. rhizogenes* 15834 habe ich daher nach Agrocinresistenten gesucht. Erste Versuche haben gezeigt, daß *A. rhizogenes* 15834 auf dem Basalmedium(mit 2 % Agar) nach Stonier 1960 nur sehr langsam wächst und eine exakte Durchführung des üblichen Tests für *A. rhizogenes* 15834 nicht möglich ist. Nach Prüfung verschiedener Medien habe ich schließlich anstatt Basalmedium nach Stonier NB + Agar verwendet und bei gleich gebliebenen Bedingungen gute Resultate erzielt.

#### Durchführung des Tests:

Von einer gut gewachsenen 48 h -NB-Kultur von *A. radiobacter* 84(K84) wird 0,1 ml Bakteriensuspension in einen Kolben mit 30 ml Basalmedium nach Stonier gegeben und die Bakterien in diesem Medium für 48 h bei 28°C im Schüttelbad bebrütet. Dann werden 2 ml der *A. radiobacter* 84-Suspension in einem Reagenzglas mit 4 ml Basalmedium(enthält 0,9 % Agar) bei 35-40°C gemischt, mit einer Pipette auf die Mitte von NB + - Agar Platten getropft. Die mit Tropfen versehenen Platten werden drei Tage bei Zimmertemperatur gehalten. Zugleich werden 0,1 ml einer zu testenden Bak-

terienkultur(hier *A. rhizogenes* 15834) mit 10 ml Basalmedium nach Stonier bei Zimmertemperatur inkubiert und so für den Test auf Agrocinempfindlichkeit sensibilisiert.

Nach drei Tagen werden die Platten mit den *A. radio-bacter* 84-Tropfen für 20 min mit Chloroform bedampft indem die Platten mit der Agarschicht nach unten über eine Glaspetrischale mit Chloroform gelegt werden. So werden auf der Agaroberfläche befindliche Bakterien abgetötet. Dann werden die Agar-Platten ohne Deckel zur vollständigen Entfernung des Chloroforms 20-30 min auf dem Steriltisch begast. Anschließend werden 2,5 ml sensibilisierte Bakterien mit 2,5 ml Puffer-Agar(enthält 7 % Agar)(pH=7,0) bei 35-40°C im Reagenzglas gemischt und auf die mit Chloroform behandelten Platten gegossen. Nach Erstarrung des Agars werden Platten bei 27°C drei Tage inkubiert. Aus den durch Agrocine 84 bedingten Hemmhöfen des Bakterienwachstums(*A. rhizogenes* 15834) lassen sich nach weiterer Inkubation(3 Tage) bei 27°C agrocine-resistente Kolonien leicht isolieren und auf ihre Virulenz prüfen.

Ich habe dieses Verfahren der Isolierung agrocine-resistenter Kolonien von *A. rhizogenes* 15834 dreimal

angewandt und unter agrocin-resistenten Kolonien 160 ausgewählt und sie auf ihre Virulenz getestet. Darüberhinaus wurde der Test auf Agrocinempfindlichkeit (Hemmhofbildung) zur Charakterisierung von Bakterienstämmen verwendet. (s.S. 32 ).

e) VERSUCHE ZUR ÜBERTRAGUNG DER VIRULENZ VON A. TUMEFACIENS AUF A. RHIZOGENES DURCH KONJUGATION AUF FESTEM MEDIUM:

3Co3, ein avirulenter, antibiotika-resistenter Abkömmling von A. rhizogenes 15834 wurde als Rezipient, A. tumefaciens Stamm B6-806 wurde als Donor verwendet. Beide Stämme wurden zuerst getrennt von einander 48 h lang in NB/10 bei 28°C im Schüttelbad kultiviert. Dann wurden sie abzentrifugiert und mit 5 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Extinktionswerte bei 660 nm wurden gemessen, und die Bakterienzahl pro ml wurde eingestellt. 10<sup>8</sup> Donorbakterien bzw. 10<sup>7</sup> Rezipientbakterien wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O vermischt, auf Bakterienfilter (Sartorius, Porengröße 0,15 µm) filtriert und die Filter auf Platten mit einem synthetischen Medium (nach Kerr 1977) mit 2 % Agar, 2 g/l Octopin und Vitaminen (Lippincott et al. 1973) für 7 Tage bei 27°C inkubiert. Zur Isolierung der möglichen Transkonjuganten habe

ich das Donor-Rezipienten-Gemisch auf den Filtern nach 7-tägiger Inkubation in 4 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert, 10<sup>3</sup>-fach verdünnt und auf Selektivagar(NB/10 mit 2 % Agar, 1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin) plattiert. Resistente Kolonien wurden isoliert und auf ihre Virulenz geprüft.

Alle virulenten Kolonien wurden den Tests auf Ketolactoseproduktion und Citratverwertung(s.o.) unterworfen. Unter den virulenten Kolonien wurden 31 zufällig gewählte Kolonien mit allen weiteren beschriebenen Tests charakterisiert.

Später wurde dieser Versuch modifiziert und als Transkonjugationsmedien folgende Medienkombinationen verwendet:

- 1) BM + V mit 2 % Agar, ohne Zusatz von Octopin.
- 2) NB/10 + 2 g/l Octopin mit 2 % Agar.
- 3) BM + V + 2 % Agar, Octopin ersetzt durch Octopinbausteine(Arginin, Pyruvat) oder Octopinverwandte Substanzen(Agmatin, Carnosin).

f) DURCHFÜHRUNG DES EXPERIMENTS IN FLÜSSIGEM MEDIUM:

Das Experiment zur Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* auf festem Substrat konnte zwar mit Erfolg durchgeführt werden, aber während der Fil-

tration und Resuspendierung der Bakteriengemische besteht immer wieder Gefahr der Kontamination. Deshalb habe ich versucht, erstmals Transkonjugationsexperimente an Agrobakterien im flüssigen Medium durchzuführen. Bei solchen Experimenten können Filtration der Bakterien, Inkubation der Bakteriengemische auf Filtern und Resuspendierung der Bakterien unterbleiben. Erfahrungen mit *E. coli* zur Übertragung des F-Faktors durch Konjugation in flüssigen Medien deuteten an, daß diese Möglichkeit auch für *A. rhizogenes* realisierbar sein könnte. (U. Winkler, W. Rüger, W. Wackernagel. 1972).

Donor- und Rezipientenbakterien wurden getrennt von einander in NB/10 bei 28°C gezüchtet, ihre Titer pro ml ermittelt und in Transkonjugationsmedium gegeben. (jeweils 4-5 ml Medium mit zu testenden Substanzen oder in Kombinationen mit Octopin).

2 Rezipienten-Donor-Verhältnisse wurden verwendet:

- |      |   |  |
|------|---|--|
| 1:10 | - | 10 <sup>7</sup> Zellen von 3Co3(Rezipient) mit |
|      |   | 10 <sup>8</sup> Zellen von B6-806(Donor)       |
| 1:1  | - | 10 <sup>8</sup> Zellen von 3Co3(Rezipient) mit |
|      |   | 10 <sup>8</sup> Zellen von B6-806(Donor).      |

Nach 7-14 -tägiger Inkubation bei 27°C ohne Belüftung wurden die Bakteriengemische 10<sup>3</sup>-fach verdünnt (selten auch unverdünnt) und auf Selektivagar(NB/10

mit 1000 ug/ml Streptomycin, 3 ug/ml Gentamycin und 2 % Agar) plattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 27°C wurden zufallsgemäß Kolonien isoliert und charakterisiert. Bei diesen Versuchen habe ich die Kolonien, bzw. die Bakterienstämme durch folgende Tests identifiziert:

- a) Verwertung von Citrat in Gegenwart von 0,0005 % Hefe-Extrakt.
- b) Produktion von Ketolactose.
- c) Virulenz an Blättern und Sprossen von *Kalanchoe daigremontiana*. (Tumorbildung)

Bei zwei Kombinationen der verwendeten Transkonjugationsmedien konnte ich keine Antibiotika-Resistente auf dem Selektivagar isolieren. Hier wurde lethale Wechselwirkung zwischen Bakterienstämmen unter Transkonjugationsbedingungen angenommen. (s.u.)

#### TRANSKONJUGATIONSMEDIEN:

Bei allen Transkonjugationsversuchen wurden Medien folgender Zusammensetzungen verwendet:

- a) Basalmedium (BM) nach Kerr (1977) mit Vitaminzusatz (V) (Lippincott 1973)
- b) BM + V + 2 g/l Octopin.
- c) BM + V + 2 g/l Arginin.
- d) BM + V + 2 g/l Agmatin.

- e) BM + V + 2 g/l Carnosin.
- f) BM + V + 2 g/l Pyruvat.
- g) BM + V + 2 g/l Octopin + 2 g/l Arginin.
- h) BM + V + 2 g/l Octopin + 1 g/l Arginin.
- i) BM + V + 2 g/l Octopin + 2 g/l Agmatin.
- j) BM + V + 2 g/l Octopin + 2 g/l Carnosin.
- k) BM + V + 2 g/l Octopin + 2 g/l Pyruvat.
- l) BM + V + 500 mg/l Octopin + 2 g/l Pyruvat.
- m) BM + V + 100 mg/l Octopin + 2 g/l Pyruvat.
- n) BM + V + 50 mg/l Octopin + 2 g/l Pyruvat.
- o) BM + V + 10 mg/l Octopin + 2 g/l Pyruvat.
- p) BM + V + 1 g/l Octopin.
- r) BM + V + 0,5 g/l Octopin.

Für feste Medien wurde dem jeweiligen Medium 20 g/l Agar zugesetzt.

g) EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF TRANSKONJUGATION:

Zur Feststellung der für Transkonjugationsexperimente geeignetsten Temperatur wurde der Versuch mit avirulentem antibiotika-resistenten *A. rhizogenes* 3Co3 (als Rezipient) und *A. tumefaciens* Stamm B6-806 (als Donor) im flüssigen BM + V + 2 g/l Octopin durchgeführt. Bakteriengemische wurden während der Transkonjugation bei 20°C und bei 32°C inkubiert. (Als Kontrolle auch bei 27°C). Transkonjuganten wurden wie üblich

isoliert und charakterisiert.

h) PRÜFUNG AUF ANTIBIOTISCHE WIRKUNG EINES BAKTERIEN-  
STAMMES AUF EINEN ANDEREN:

Nach Inkubation von Donorstamm B6-806 und Rezipient 3Co3 in Medien mit 2 g/l Octopin + 2 g/l Arginin und mit 2 g/l Agmatin konnten keine lebenden antibiotika-resistenten Bakterien(3Co3) wiedergefunden werden.

Eine eventuelle antibiotische Wirkung von B6-806 auf 3Co3 wurde folgendermaßen geprüft:

A. tumefaciens Stamm B6-806 allein wurde in diesen zwei Medienkombinationen bei 28°C vier Tage im Schüttelbad kultiviert. Kultursuspensionen wurden dann abzentrifugiert und die Überstände auf Filter(Porengröße 0,15 µm) filtriert. Papierscheibchen(0,5 cm Ø) wurden mit diesen Flüssigkeiten getränkt und auf mit hoher Zellkonzentrationen von 3Co3 versehenen NB + Agar-Platten plattiert, für 48 h bei 27°C inkubiert. Hemmhöfe um die Papierscheibchen zeigten die Gegenwart antibiotisch wirkender Substanzen an.

i) TRANSKONJUGATIONSEXPERIMENTE MIT ANDEREN BAKTE-  
RIENSTÄMMEN:

A. rhizogenes 15834 wurde auf NB/10 mit 1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin und 2 % Agar plattiert. Eine Resistente-Kolonie wurde isoliert und auf ihre Virulenz geprüft. Dieser antibiotika-resistente, virulente A. rhizogenes 15834-R wurde dann mit A. tumefaciens Stamm B6-806 zur Konjugation gebracht. Nach 7-tägiger Inkubation in BM + V + 2 g/l Octopin bei 27°C wurde das Bakteriengemisch  $10^3$ -fach verdünnt und auf Selektivagar (1000 ug/ml Streptomycin, 3 ug/ml Gentamycin und 2 % Agar) plattiert. Unter resistenten Kolonien wurden 48 Kolonien zufällig ausgewählt und an Kalanchoe daigremontiana auf ihre Virulenz geprüft.

ERGEBNISSE:A) EXPERIMENTE ZUR PLASMIDELIMINIERUNG BEI A. RHIZOGENES 15834:1) VERSUCHE ZUR VIRULENZELIMINIERUNG DURCH KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN IN GEGENWART VON ACRIDINEN:

Acridinfarbstoffe sind mutagene Agenzien. Sie schalten sich zwischen zwei zusammenstehende DNS-Basenpaare, so daß sie während der Replikation eine Insertion oder eine Deletion eines einzelnen Basenpaares verursachen. (E. Jawetz, J.L. Melnick, E.A.-Adelberg 1977). Hirota (1960) hat nachgewiesen, daß eine Eliminierung von F-Faktoren bei E. coli möglich ist, wenn die Bakterien in Gegenwart von Acridinorange kultiviert werden.

Es wurde daher A. rhizogenes 15834 im NB-Flüssigmedium in Gegenwart verschiedener Acridinorange-Konzentrationen bei 28°C kultiviert und das Wachstum in den Kolben an Hand der Messung der Extinktion bei 660 nm gemessen.

AO.-Konzentration	Suspensionsdichte
ug/ml	bei E=660 nm(nach 48 h)

Ausgangsdichte(25 ug/ml-

AO-Konz.)	0,03
0	0,9
1	0,59
3	0,27
5	0,058
10	0,04
15	0,035
20	0,027
25	0,03

Bereits Konzentrationen von 1 ug/ml Acridinorange bewirken eine Wachstumshemmung bei *A. rhizogenes* 158-34. Kein Wachstum findet ab 15 ug/ml AO.-Konzentration mehr statt.

Die Extinktion der konzentrierten Bakteriensuspensionen wurde auf 0,1 eingestellt, indem die Bakteriensuspensionen zunächst abzentrifugiert und nachher die Bakterien mit Tris-Puffer aufgenommen worden sind, damit beim Virulenztest an verwundeten Kalanchoe-Blättern stets die gleiche Menge und gleiche Zahl von Bakterien aufgetragen werden konnte, da Infektionserfolg von der Bakterienkonzentration abhängig ist.

Bakterien, die in geringeren Konzentrationen gewachsen waren, wurden mit folgenden Trübungswerten im Tris-Puffer auf Virulenz an Kalanchoe-Blättern geprüft:

<u>AO-Konzentration</u>	<u>Suspensionsdichte</u>
<u>ug/ml</u>	<u>E=660 nm</u>
5	0,045
10	0,07
15	0,08
20	0,07
25	0,07

Nach vier Wochen wurden Wurzeln bzw. wurzelähnliche Gebilde an Kalanchoe-Blättern festgestellt.

<u>Bakterien aus</u>	<u>Zahl der</u>	<u>Zahl der</u>	<u>Wunden mit</u>
<u>AO-Konz. (ug/ml)</u>	<u>Wunden</u>	<u>Wurzeln</u>	<u>W.ähnl. Geb.</u>
0	360	289	50
1	360	293	5
3	360	5	-
5	360	-	-
10	360	-	-
15	360	-	-
20	360	-	-
25	360	-	-

Offenbar nimmt bei AO.-Konzentrationen ab 3 ug/ml auch die Virulenz einer Population von *A. rhizogenes* 15834 ab, die Bakterien werden avirulent.

Ein solche Virulenzabnahme kann ihre Ursachen in vorübergehender Störung der Zellphysiologie haben. (s. Einleitung), oder auf Elimination von Plasmiden zurückzuführen sein. Zur Unterscheidung zwischen beiden Möglichkeiten wurden Bakterien nach der Inkubation in NB mit Acridinorange entweder in  $10^3$  verdünntem Zustand oder ohne Verdünnung (jeweils 0,1 ml) auf NB + Agar plattiert. Nach zwei-tägigem Wachstum im Brutschrank bei  $27^{\circ}\text{C}$  wurden Kolonien auf den Platten kontrolliert. Mit steigender AO.-Konzentration nahm die Zahl der Kolonien stark ab. Z.B. waren auf der Platte mit bei 5 ug/ml AO.-Konzentration gewachsenen Bakterien nur 30 Kolonien gewachsen, während auf der Platte mit in Gegenwart von 1 ug/ml AO. kultivierten Bakterien ein Bakterienrasen festzustellen war. Von jeder Platte - je nach Zahl der darauf gewachsenen Kolonien - wurden 30 - 80 Kolonien ausgewählt und wiederum auf NB + Agar vermehrt. Später wurden diese Kolonien auf ihre Virulenz geprüft, indem sie mit Hilfe eines Zahnstochers in Wunden an Kalanchoe-Blättern und - Sprossen aufgetragen wurden.

Nach vier Wochen war an jeder Wunde eine vollkommene Wurzel-Induktion zu sehen. Da bei AO.-Konzentrationen ab 10 ug/ml keine Kolonie isoliert wurde, hemmt Acridinorange bei diesen Konzentrationen nicht nur Wachstum von *A. rhizogenes* 15834 sondern tötet den *A. rhizogenes* 15834 ab. (Bakterizide Wirkung).

Bei einer von insgesamt sechs Wiederholungen dieses Versuchs habe ich auch bei 10 ug/ml AO.-Konzentration 8 Kolonien bekommen. Sie wurden auf ihre Virulenz geprüft und erwiesen sich als virulent.

Virulenzverlust, durch Acridinorange erzeugt, ist bei *A. rhizogenes* 15834 nicht von Dauer, nicht auf Plasmideliminierung zurückzuführen und damit für weitere Experimente zur Virulenzübertragung unbrauchbar.

Um doch noch zum Erfolg zu kommen, habe ich den Versuch mit Acriflavin wiederholt.

#### KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN IN GEGENWART VON ACRIFLAVIN:

Es wurde der Versuch mit einem anderen Acridinfarbstoff Acriflavin durchgeführt. Da Acriflavin auf Bakterien toxischer wirkt als Acridinorange (Hirota 1960), habe ich mit Acriflavin-Konzentrationen von 0-10 ug/ml gearbeitet. Nach vier-tägiger Inkubation zeigten die

Kulturen folgende Extinktionswerte an:

Acriflavin-Konz. ug/ml	Wachstum der Bakterien Extinktionswert(E=660 nm)
Ausgangsdichte	0,023
0	1,4
1	0,04
2	0,03
3	0,025
4	0,022
5	0,025
10	0,022

Offenbar hemmt Acriflavin das Wachstum von *A. rhizogenes* 15834 stärker als Acridinorange. Schon bei 3 ug/ml Acr.-Konzentration ist Wachstum von *A. rhizogenes* 15834 fast völlig gehemmt.

Bakterien wurden abzentrifugiert, mit 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Virulenz an Kalanchoe-Blättern geprüft. Die Auswertung erfolgte vier Wochen nach der Infizierung der Pflanzen.

<u>Bakterien aus</u> <u>Acr.-Konz. (ug/ml)</u>	<u>Zahl von</u> <u>Wunden</u>	<u>Zahl von Wunden</u> <u>mit Wurzeln</u>
0	360	294
1	360	258
2	360	6
3	360	-
4	360	-
5	360	-
10	360	-

Parallel. wurde von jeder Acr.-Konzentration 0,1 ml Suspension auf NB + Agar plattiert. Auf den Platten wurden folgende Zahlen von Kolonien gefunden:

<u>Acr.-Konzentration(ug/ml)</u>	<u>Zahl der Kolonien</u>
0	Konfluent
1	Konfluent
2	97
3	5
4	0
5	0
10	0

Von den Platten -je nach Acriflavinkonzentration- 5 - 97 Kolonien- wurden kolonien ausgewählt und auf NB + Agar aufgetragen. Nach zwei-tägiger Inkubation

bei 27°C wurden alle auf ihre Virulenz an *Kalanchoe daigremontiana* geprüft. Alle Kolonien erwiesen sich als Virulent.

Auch mit Acriflavin tritt also vorübergehender Virulenzverlust der Population ein. Solche Virulenzverluste sind für geplante Experimente nicht von Nutzen. Deshalb habe ich den Versuch mit Hilfe von UV bestrahlten Bakterien wiederholt.

## 2) KULTIVIERUNG DER UV BESTRAHLTEN BAKTERIEN IN GEGENWART VON ACRIDINORANGE BZW. ACRIFLAVIN:

Watanabe (1961) hat gezeigt, daß bei *Shigella*-Arten mit Hilfe von UV-Bstrahlung eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Plasmidelimitation durch Acridine zu erzielen ist. Die Versuche zur Plasmidelimitierung bei *A. rhizogenes* 15834 wurden daher mit UV bestrahltem *A. rhizogenes* 15834 durchgeführt. Nach UV-Bestrahlung und Kultivierung in Gegenwart von Acridinorange bzw. Acriflavin wurden die Bakterien aus Kulturmedien auf NB + Agar plattiert und später von jeder Platte 10 Kolonien ausgewählt. Diese Kolonien wurden dann;

- a) auf ihre Fähigkeit zum Octopinabbau,
- b) auf ihre Virulenz an *K. daigremontiana* geprüft.

Octopinabbau-Test wurde deshalb durchgeführt, weil eine eventuelle Plasmideliminierung durch diesen Test früher als durch einen Virulenztest an *K. daigremontiana* festzustellen ist.

Nach vier-tägiger Inkubation im Monod's 'S' Medium mit Vitaminen (Lippincott et al. 1973), und 0,05 g/l Octopin wurden die Zelldichten bestimmt (Bei E=660), dann wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Überstände wurden auf restlichen Octopin-Gehalt mit Hilfe der Diacetyl-Reaktion geprüft.

Je 10 Kol. selekt.auf	Kolonie Nr.	Suspensionsdichte (E=660 nm)	% - Octopin- Abbau.
1 ug/ml AO.	1	1,0	87,08
	2	1,0	85,85
	3	0,975	86,63
	4	1,0	82,93
	5	0,975	77,2
	6	1,1	74,72
	7	0,95	72,36
	8	0,875	79,22
	9	1,0	72,48
	10	0,95	78,02
2 ug/ml AO.	1	0,975	75,5
	2	0,85	84,39
	3	1,0	85,74
	4	0,95	87,65
	5	0,98	67,65
	6	0,95	76,86
	7	1,0	81,47
	8	0,9	80,34
	9	0,9	86,75
	10	0,8	88,32

Je 10 Kol. Kolonie selekt.auf	Nr.	Suspensionsdichte (E=660 nm)	% - Octopin- Abbau.
4 ug/ml AO.	1	0,73	74,39
	2	0,78	78,43
	3	1,1	78,66
	4	0,53	64,61
	5	0,95	77,53
	6	0,85	78,77
	7	0,9	85,06
	8	1,0	-
	9	0,95	75,51
	10	0,66	60,23
5 ug/ml AO.	1	0,95	89,89
	2	1,0	81,13
	3	0,77	-
	4	0,95	76,63
	5	0,95	81,69
	6	0,95	100
	7	0,9	80,0
	8	0,9	75,17
	9	0,9	83,6
	10	0,95	62,93

Je 10 Kol. Kolonie Suspensionsdichte % - Octopin-  
 selekt.auf Nr. (E=660 nm) Abbau.

1 ug/ml Acr	1	0,9	81,35
	2	0,99	84,5
	3	1,2	84,27
	4	0,91	86,75
	5	1,0	69,11
	6	1,2	97,03
	7	0,975	84,61
	8	0,95	82,36
	9	0,9	87,65
	10	0,8	97,41

4 ug/ml Acr	1	1,0	96,85
	2	0,9	78,43

5 ug/ml Acr	1	0,76	79,78
	2	0,75	77,31
	3	0,75	58,88
	4	0,75	81,92
	5	0,75	65,29
	6	0,74	50,0
	7	0,75	82,36
	8	0,75	88,32
	9	0,76	78,88
	10	0,75	84,05

KONTROLLE: UV behandelt, aber nicht in Gegenwart von Acridinen gewachsen.

Kolonie Nr.	Suspensionsdichte (E=660 nm)	% - Octopin- Abbau.
1	0,8	71,24
2	0,76	62,48
3	0,8	77,53
4	0,8	49,67
5	0,775	69,11
6	0,79	83,94

KONTROLLE: Weder mit UV noch mit Acridinen behandelt.

Kolonie Nr.	Suspensionsdichte (E=660 nm)	% - Octopin- Abbau.
A. rhizo. 15834	0,775	98,315
A. tum. C58	0,875	14,84
A. tum. T37	0,5	12,36

A. tumefaciens Stamm C58 und Stamm T37 sind Stämme, die Octopin nicht abbauen können. Statt Octopin bauen

sie Nopalin ab. Unter gleichen Bedingungen bauen dagegen alle *A. rhizogenes* 15834 Kolonien, die nach UV-Behandlung auf AO. oder Acr. isoliert werden, Octopin ab, und zeigen gutes Wachstum. Alle diese Kolonien zeigten Virulenz an *Kalanchoe daigremontiana*.

Somit ist kein Indiz für Plasmidelimitation vorhanden.

### 3) KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN IN GEGENWART VON ETHIDIUMBROMID:

Ethidiumbromid (EBr.) schiebt sich zwischen benachbarte Basen der DNS-Doppelhelix, und so entfaltet sich die Superhelix, bis die offene Ringform des DNS-Molekuls erreicht ist. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von EBr. hat die Bildung einer Superhelix mit umgekehrtem Drehsinn zur Folge. (S.B. Primose, 1976). Slonimski, P.P. (1968) hat die mutagene Wirkung von EBr. bei Hefe nachgewiesen. Bor-Chian und Kado, C.I. (1977) haben gezeigt, daß durch die Kultivierung von virulenten *A. tumefaciens* Stamm C58 in Gegenwart von EBr. avirulente Mutanten in einer Bakterienpopulation produziert werden können. Das könnte durchaus einen weiteren Weg zur Gewinnung avirulenter Isolate auch von *A. rhizogenes* 15834 bedeuten.

Daher wurde *A. rhizogenes* 15834 in Gegenwart steigender Konzentrationen von EBr. im NB bei 28°C kultiviert. (für 48 h.).

EBr.-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Suspensionsdichte ( $E=660 \text{ nm}$ )
Ausgangsdichte	0,02
0	0,76
1	0,63
2	0,58
3	0,47
4	0,43
5	0,41
6	0,37
7	0,31
8	0,26
9	0,25
10	0,2

Mit steigender Konzentration von EBr. nimmt das Wachstum der *A. rhizogenes* 15834-Suspension ab. Die gewachsene *A. rhizogenes* 15834-Population wurde an *K. daigremontiana* auf Virulenz geprüft. Vier Wochen nach der Infektion zeigten alle Pflanzen Wurzelbildung, also

kein Virulenzverlust ist mit Wachstumshemmung verknüpft.

EBr.-Konz. ( $\mu$ M)	Zahl der Wunden	Zahl der Wunden mit Wurzelbildung.
0	360	279
1	360	261
2	360	237
3	360	280
4	360	272
5	360	211
6	360	243
7	360	222
8	360	195
9	360	224
10	360	209

Damit war klar, daß wenigstens mit diesen EBr.-Konzentrationen bei *A. rhizogenes* 15834 keine Plasmideliminierung zu erwarten ist. Deshalb wurde in weiteren Experimenten die EBr.-Konzentration erhöht. Die Inkubationszeit war diesmal 6-Tage und nach der Inkubation zeigten die Kulturen folgende Suspensionsdichten an:

EBr.-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Suspensionsdichte ( $E=660 \text{ nm}$ )
Ausgangsdichte	0,025
0	1,4
60	0,27
70	0,04
80	0,025

Das Wachstum der Bakterien nahm mit weiter steigender Konzentration von EBr. weiter ab, um bei 70-80  $\mu\text{M}$  EBr.-Konzentration ganz zu unterbleiben.

Wurden Pflanzen mit der Bakteriensuspension aus 80  $\mu\text{M}$  EBr.-Konzentration infiziert, zeigte sich nach vier Wochen keine Wurzelbildung. Die Bakterienpopulation war avirulent geworden. Bakterien, die 6 Tage bei 60-80  $\mu\text{M}$  EBr. inkubiert waren, wurden auf NB + Agar plattiert. Nach zwei-tägiger Inkubation im Brutschrank bei  $27^{\circ}\text{C}$  wurden 12 - 64 Kolonien ( auf der Platte mit 80  $\mu\text{M}$  EBr. behandelten Bakterien waren nur 12 Kolonien gewachsen) von jeder Platte ausgewählt und wiederum auf NB + Agar-Platten vermehrt. Später wurden mit diesen Bakterien Kalanchoe-Pflanzen infiziert. Nach vier Wochen waren an alle Pflanzen Wurzeln entstanden.

Wiederholungen der EBr.-Experimente mit wesentlich verminderten Bakterien-Ausgangskonzentrationen (100 Bakt/ml) brachten prinzipiell das gleiche Ergebnis:

Alle Isolate waren virulent!

Damit verhält sich EBr. wie die Acridinfarbstoffe.

Es reduziert Wachstum von *A. rhizogenes* 15834 und Virulenz einer behandelten Population vorübergehend.

Dauerhafter Virulenzverlust wird nicht bewirkt.

4) VERSUCHE ZUR ISOLIERUNG SPONTAN AVIRULENTGEWORDENER *A. RHIZOGENES* 15834 MIT HILFE DER RESISTENZ GEGEN AGROCIN 84:

Üblicherweise ist bei *A. tumefaciens* die Virulenz gekoppelt mit der Empfindlichkeit für Agrocin 84. (Engler et al. 1975). Es wurde daher angenommen, daß auch Fähigkeit zur Wurzelinduktion bei *A. rhizogenes* 15834 stets mit der Agrocinempfindlichkeit gekoppelt ist. (Albinger und Beiderbeck 1977). Unter dieser Vorstellung wurde unter Agrocinresistenten Kolonien aus *A. rhizogenes* 15834 nach avirulenten Derivaten gesucht.

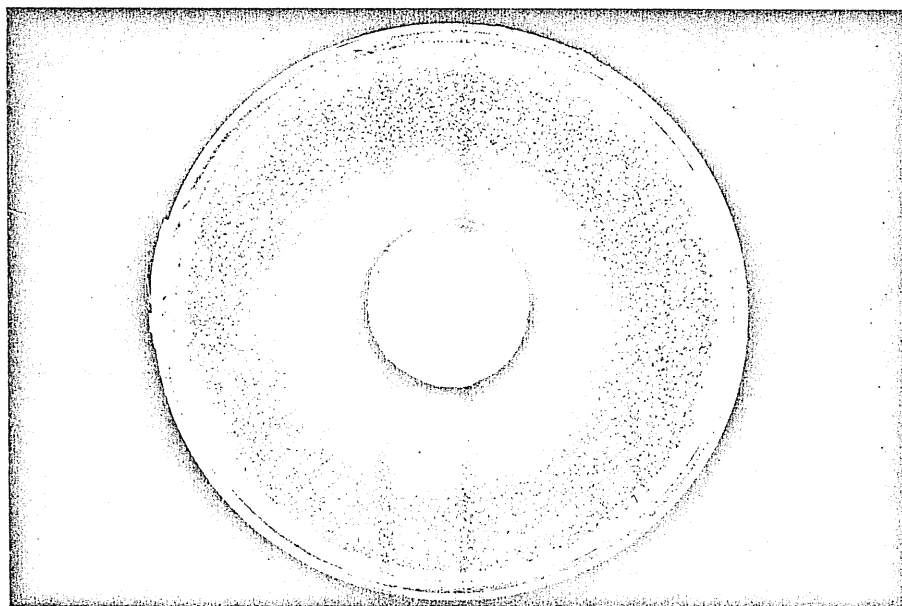
Auf Platten, die nach Präinkubation mit *A. radiobacter* 84 nunmehr Agrocin 84 enthielten, wurden plattiert:

a) *A. tumefaciens* Stamm C58, ein Stamm von *A. tumefaciens*, bei dem Virulenz und Agrocinempfindlichkeit ge-

koppelt sind. (Engler et al. 1975). (Als Kontrolle des Verfahrens)

b) *A. rhizogenes* 15834.

Nach zwei Tagen Inkubation ist Hemmhof auf der Platte (NB + Agar) sichtbar. Nach weiteren drei Tagen bei 27°C im Brutschrank zeigen sich im Wirkungsfeld des Agrocins vereinzelt resistente, gut wachsende Kolonien.



---

Empfindlichkeit von *A. rhizogenes* 15834 für Agrocin 84. (3 Tage alt).

---

160 solcher resistenten Kolonien von *A. rhizogenes* 15834 und 20 resistente Kolonien von *A. tumefaciens* C58 wurden zufällig ausgewählt. Alle diese Kolonien wurden auf Virulenz an Kalanchoe-Pflanzen geprüft.

Vier Wochen nach der Infektion wurde festgestellt, daß;

a) alle Agrocin-Resistente des Kontrollstammes C58 von *A. tumefaciens* avirulent waren. Sie verhielten sich damit erwartungsgemäß. (Engler et al. 1975).

b) unter 160 agrocinresistenten Kolonien von *A. rhizogenes* 15834 nur 7 Kolonien keine Wurzelinduktion verursacht hatten, also avirulent geworden waren. Das zeigt, daß die Kopplung zwischen Virulenz und Agrocinempfindlichkeit bei *A. rhizogenes* 15834 wenig stabil ist.

Diese 7 avirulenten, agrocinresistenten Kolonien habe ich subkloniert und unter den Subklonen von 6 Kolonien jeweils eine Kolonie, von der siebten Kolonie zwei Kolonien ausgewählt und ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften mit denen von *A. rhizogenes* 15834 verglichen. Abgesehen von der Virulenz, zeigten alle Kolonien die gleichen Eigenschaften von *A. rhizogenes* 15834. (s. Tabelle I ).

Damit war also eine wichtige Voraussetzung für Virulenzübertragungsexperimente erfüllt:

Avirulente Derivate von *A. rhizogenes* 15834 waren gefunden!

B) CHARAKTERISIERUNG VON A. RHIZOGENES 15834 UND  
SEINEN DERIVATEN IN BIOLOGISCHEN UND BIOCHEMISCHEN  
TESTS UND VERGLEICH MIT A. TUMEFACIENS B6-806:

1) PRODUKTION VON KETOLACTOSE:

Sowohl bei *A. rhizogenes* 15834 als auch bei allen seiner avirulenten Derivaten ist eine Ketolactoseproduktion ganz im gegensatz zu *A. tumefaciens* B6-806 nicht nachweisbar. Albinger(1976) hatte für *A. rhizogenes* 15834 dasselbe Ergebnis erhalten.

2) VERWERTUNG VON CITRAT IN GEGENWART VON 0,0005 %  
HEFEEXTRAKT:

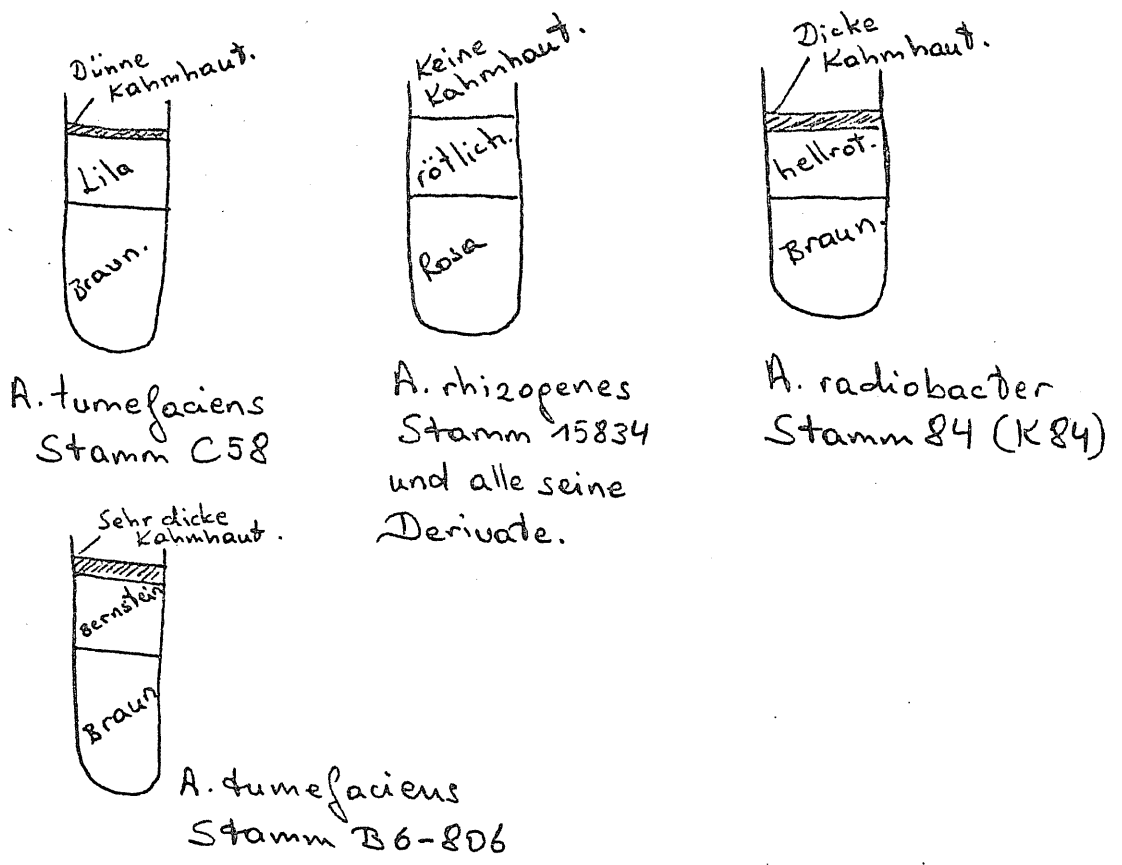
*A. rhizogenes* 15834 verwertet Citrat basisch, d.h. auf der Brutstelle ändert sich die olivgrüne Farbe des Mediums(von Bromthymolblau) in Blau. Alle avirulenten Derivate von *A. rhizogenes* 15834 verhalten sich wie *A. rhizogenes* 15834. *A. tumefaciens* Stamm B6-806 verwertet Citrat dagegen sauer, d.h. die olivgrüne Farbe des Mediums macht auf der Platte einen Farbumschlag nach Gelb.

3) ABBAU VON OCTOPIN:

A. rhizogenes 15834, seine avirulenten Derivate und A. tumefaciens Stamm B6-806 bauten Octopin ab. Da A. rhizogenes-Stämme Octopin langsamer als A. tumefaciens-Stämme abbauen (Lippincott und Beiderbeck 1973), habe ich den Test immer nach vier-tägiger Inkubation im Schüttelbad ausgewertet. (Albinger 1976).

4) LACKMUSMILCH REAKTION:

Nach drei-wöchiger Inkubation im Brutschrank bei 27°C entstehen in Reagenzgläsern unten abgebildete Farbzonen:



5) WACHSTUM BEI 35°C IM SCHÜTTELBAD:

Wachstum bei 35°C in NB kann zur Unterscheidung von *A. rhizogenes* 15834 und seiner Derivate und dem *A. tumefaciens* Stamm B6-806 verwendet werden. Die Kolben mit *A. rhizogenes* 15834 oder mit *A. tumefaciens* B6-806 zeigten etwa gleiche Ausgangsextinktion von 0,05 bei E=660 nm. an.

<u>Nach....-stündiger</u>	<u>Suspensionsdichte</u>
<u>Inkubation.</u>	<u>(E=660)</u>
Ausgangsextinkt.	0,05
<i>A. rhizo.</i> ( 24 Std.)	0,158 (34°C)
" ( 48 Std.)	0,16 (34,5°C)
" ( 72 Std.)	0,15 (35°C)
" ( 105 Std.)	0,11 (35°C)
" ( 144 Std.)	0,098 (35°C)
<i>A. tum.</i>	
B6-806 ( 48 Std.)	0,5 (34,5°C)

*A. tumefaciens* B6-806 wurde bei dieser Temperatur im Wachstum nicht gehemmt.

In Verbindung mit diesem Test möchte ich noch eine Eigenschaft von *A. rhizogenes* 15834 erwähnen.

Im Schüttelbad zeigten sich ebenfalls Unterschiede

im Wachstumsverhalten zwischen den einzelnen Stämmen:

a) *A. tumefaciens*-Stämme B6-806, C58, T37 und *A. radiobacter* Stamm 84 lassen während ihres Wachstums in NB Klumpen mit 0,5 - 1,0 mm Durchmesser entstehen.

b) *A. rhizogenes* 15834 und alle seine Derivate wachsen dagegen vollkommen homogen in Nährbrühe. (NB).

#### 6) DIE AUSBREITUNG VON BAKTERIENSTÄMMEN AUF WEICH- AGAR:

*A. tumefaciens* Stamm B6-806 und *A. radiobacter* Stamm 84 breiten sich auf Weichagar aus und legen innerhalb 24 Std. 12-15 mm zurück, während sich *A. rhizogenes* 15834 und alle seine Derivate nicht ausbreiten.

#### 7) EMPFINDLICHKEIT BZW. RESISTENZ GEGENÜBER AGROCIN 84:

*A. rhizogenes* 15834 ist für Agrocin 84 empfindlich, *A. tumefaciens* Stamm B6-806 und die avirulenten Derivate von *A. rhizogenes* 15834 sind dagegen für Agrocin 84 unempfindlich.

#### 8) VIRULENZ AN KALANCHOE DAIGREMONTIANA:

*A. rhizogenes* 15834 induziert an Kalanchoe-Blättern und -Sprossen nach Wundinfektion Wurzelbildung, *A. tumefaciens* Stamm B6-806 Tumorbildung.

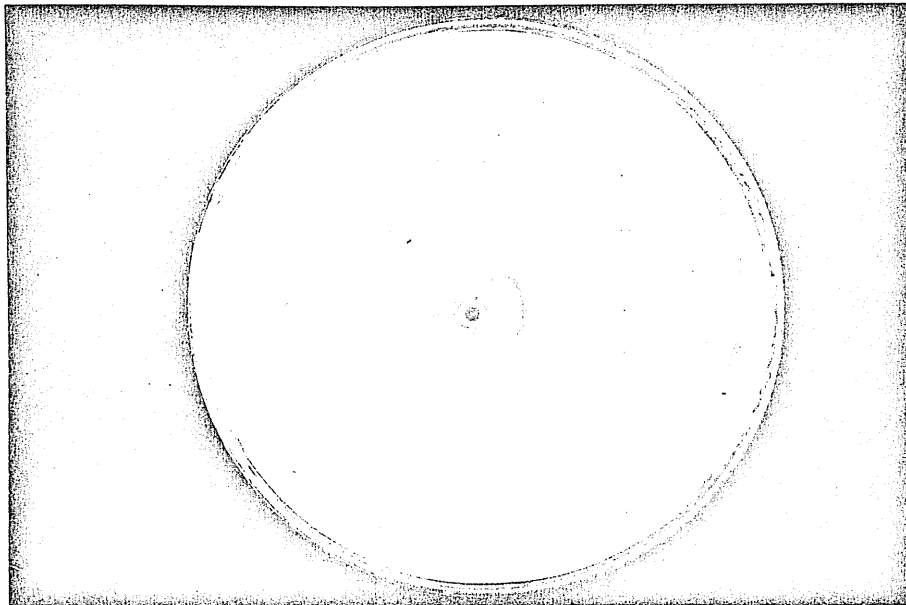
Avirulente Derivate von *A. rhizogenes* 15834 beeinflussen die normale Wundreaktion nicht in erkennbarer Weise.

9) PRODUKTION VON AGROCINS:

Dieser Test wurde zur Unterscheidung der avirulenten Derivate von 15834 und *A. radiobacter* 84 verwendet. Anstatt *A. radiobacter* 84 wurden Derivate von *A. rhizogenes* 15834 auf die Mitte der Platten getropft und zur Ermittlung eventuell produzierten Agrocins wurde *A. rhizogenes* 15834 wie im Test für Empfindlichkeit für Agrocin 84 plattiert.

10) EMPFINDLICHKEIT FÜR PHAGEN PS8:

Der Phage PS8 ist virulent für *A. tumefaciens* Stamm B6-806. *A. rhizogenes* 15834 und alle seine Derivate sind gegen diesen Phagen resistent.



---

Resistent von 3Co3 gegen Agrocine 84.

---

Empfindlichkeit von *A. tumefaciens* C58 für  
Agrocine 84. (5. Tag).

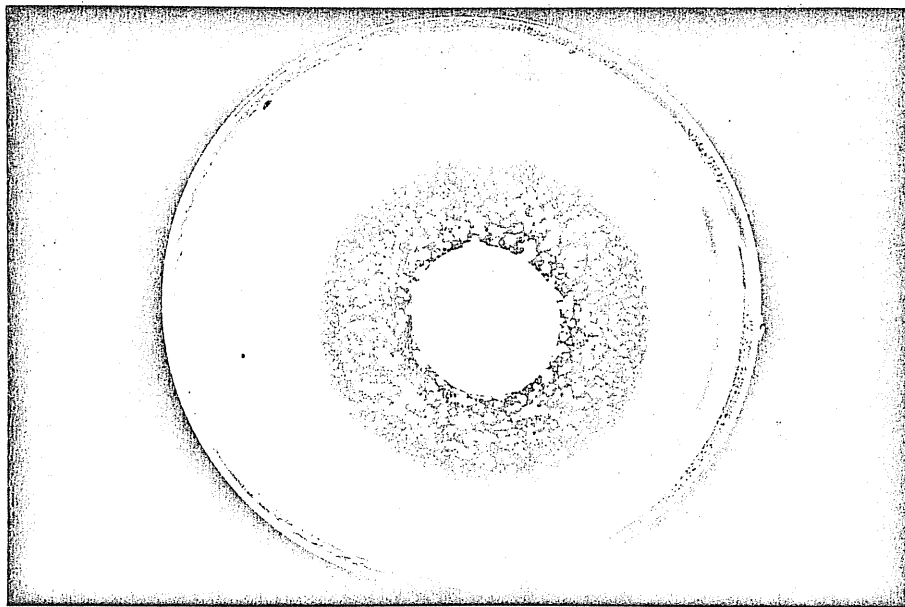


TABELLE: I

A. rhizogenes Avirulente Derivate A. tum. A. radiob.  
 15834 von A. rhiz. 15834 B6-806 84

Ketolactosepro-					
duktion.	-	-	+	-	-
Verwertung von					
Citrat	b	b	s	b	b
Abbau von Octo-					
pin.	+	+	+	+	+
Lackmusmilch-R.	rosa	rosa	braun	braun	braun
Wachstum bei 35°C	-	-	+	+	+
Ausbreitung auf					
Weichagar.	-	-	+	+	+
Empfindlichkeit					
für PS8	-	-	+	-	-
Virulenz	W	-	T	-	-
Agrocinprodukt.	-	-	-	+	+
Agrocin 84-Empf.	+	-	-	-	-

C) EXPERIMENTE ZUR ÜBERTRAGUNG DER VIRULENZ VON  
A. TUMEFACIENS AUF A. RHIZOGENES DURCH KONJUGATION  
(IN VITRO):

Nachdem A. Kerr (1969, 1977) und Genetello et al. (1977) zeigen konnten, daß eine Virulenzübertragung zwischen einem virulenten Stamm und einem avirulenten Stamm von *A. tumefaciens* sowohl in planta als auch in vitro möglich ist, wurden umfangreiche Experimente in dieser Richtung durchgeführt. Erst durch diese Untersuchungen wurde klar, daß einige Eigenschaften der virulenten Agrobakterien mit Virulenz gekoppelt sind und die verantwortlichen Gene gemeinsam mit dem für Virulenz auf einem Plasmid lokalisiert sind. (Genetello et al. 1977, Kerr 1977, Engler et al. 1975). Albinger und Beiderbeck (1977) haben gezeigt, daß auch *A. rhizogenes* 15834 die Fähigkeit zur Virulenzübertragung besitzt. Die Fähigkeit zur Wurzelinduktion kann in planta von *A. rhizogenes* auf *A. tumefaciens* übergehen.

In vitro erfolgt Virulenzübertragung zwischen Stämmen von *A. tumefaciens* ausschließlich in Gegenwart des Argininderivates Octopin. Octopin befindet sich als ungewöhnliche Aminosäure in Geweben solcher pflanzlichen Tumoren, die durch Octopin abbauende virulent-

te Stämme von *A. tumefaciens* induziert worden sind. Ein ähnliches Argininderivate ist Nopalin. Diese ungewöhnliche Aminosäure findet man in Tumorgewebe, die von zum Nopalinabbau fähigen *A. tumefaciens*-Stämmen induziert worden sind. (Morel et al. 1969, Petit et al. 1970). Es gibt aber *Agrobacterium*-Stämme, die Tumoren induzieren, die weder Octopin noch Nopalin enthalten. (Petit et al. 1970).

Die Fähigkeit zum Abbau von Octopin und/oder Nopalin korreliert in der Regel mit Virulenz. Geht einem Bakterien-Stamm das Plasmid verloren, verschwindet auch seine Fähigkeit zum Abbau der Argininderivate. (Bomhof et al. 1976, Engler et al. 1975). In durch *A. rhizogenes* - Arten induzierten Tumoren wurde weder Octopin noch Nopalin festgestellt. (Hooykaas et al. 1979<sub>b</sub>).

Nachdem es mir gelungen war, avirulente Mutante von *A. rhizogenes* 15834 zu erzielen, konnte ich den zweiten Schritt machen, nämlich, die Möglichkeit zur Übertragung der Virulenz von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* in vitro zu untersuchen und dabei möglicherweise der Frage nachzugehen, ob bei der Fähigkeit zur Wurzelinduktion, außer dem Plasmid, auch das bakterielle Chromosom eine Rolle spielt?

1) ISOLIERUNG DER ANTIBIOTIKA-RESISTENTEN, AVIRULEN-  
TEN MUTANTE VON A. RHIZOGENES 15834:

Für Virulenzübertragung müssen ein Donor-Stamm(trägt Virulenz) und ein Rezipient-Stamm(avirulent, soll virulent gemacht werden) unter Bedingungen gebracht werden, die Plasmidtransfer erlauben. Nach erfolgter Virulenzübertragung ist es nötig, Rekombinanten-Individuen(Transkonjuganten) aus der Population der Donor- und Rezipienten-Individuen herauszufinden. Das sollte auf folgende Weise erreicht werden:

<u>Donor-Stamm</u>		<u>Rezipintem-Stamm</u>
A. tumefaciens Stamm	X	3Co3, avirulente Deri-
B6-806		vate von A. rhizogenes
(Empfindlich für Antibiotika)		15834
		(Resistent gegen Anti-
		biotika)

Rekombinanten

(Rekombinanten sollten sich unter den anti-  
biotika-resistenten befinden und sich durch  
Virulenz-Test an kalanchoe erkennen lassen)

Damit ein solches Rekombinationsexperiment durchgeführt werden konnte, war es nötig, von einem der erhaltenen avirulenten Abkömmlinge von A. rhizogenes 15834

ein antibiotika-resistente Mutante zu erhalten.

Dazu wurde Co3, ein Subklon eines avirulenten Abkömmlings von A. rhizogenes 15834, auf NB/10 + 2 % Agar mit 1000 ug/ml Streptomycin plattiert und eine resistente Kolonie ausgewählt. Diese Streptomycin-resistente Mutante von 3Co wurde dann auf NB/10 + 2 % Agar mit 3 ug/ml Gentamycin plattiert. Wiederum wurden Kolonien resistenter Bakterien isoliert. Diese zeigten auch bei gleichzeitiger Verwendung beider Antibiotika ein gutes Wachstum auf NB/10 + 2 % Agar. Unter diesen Kolonien gegen beide Antibiotika resistenter Mutanten habe ich eine, 3Co3, als Rezipient in allen meinen Konjugationsversuchen verwendet.

TABELLE: II

Tests	Bakterienstämme	
	A. rhizo.	A. tumefaciens
	15834	B6-806
	3003	
VIRULENZ	W	T
Ketolactosepro-		
duktion	-	+
Citratverwertung	b	s
Agrocin-Empf.		
(Agrocin 84)	+	-
Epmf. für. PS8	-	-
Lackmusmilch-R.	rosa	braun
Antibiotika-Resis-		
tenz	-	-
(gegen Streptomycin und Gentamycin)	+	-

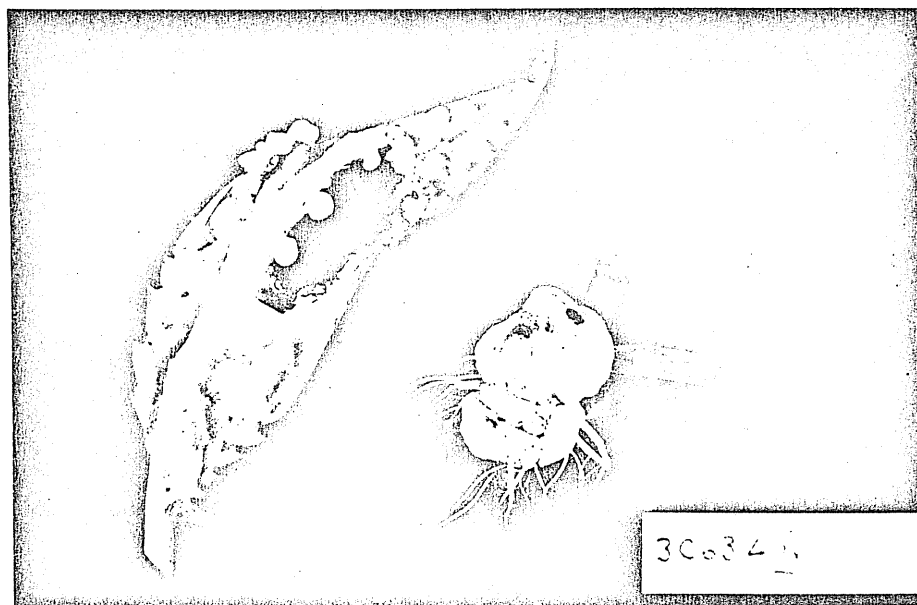
3Co3 ist echtes Derivat von *A. rhizogenes* 15834, er verhält sich in allen untersuchten Charakteristika wie *A. rhizogenes* 15834 mit Ausnahme von Virulenz und Antibiotika-Resistenz.

Damit sind Virulenzübertragungsexperimente in vitro möglich.

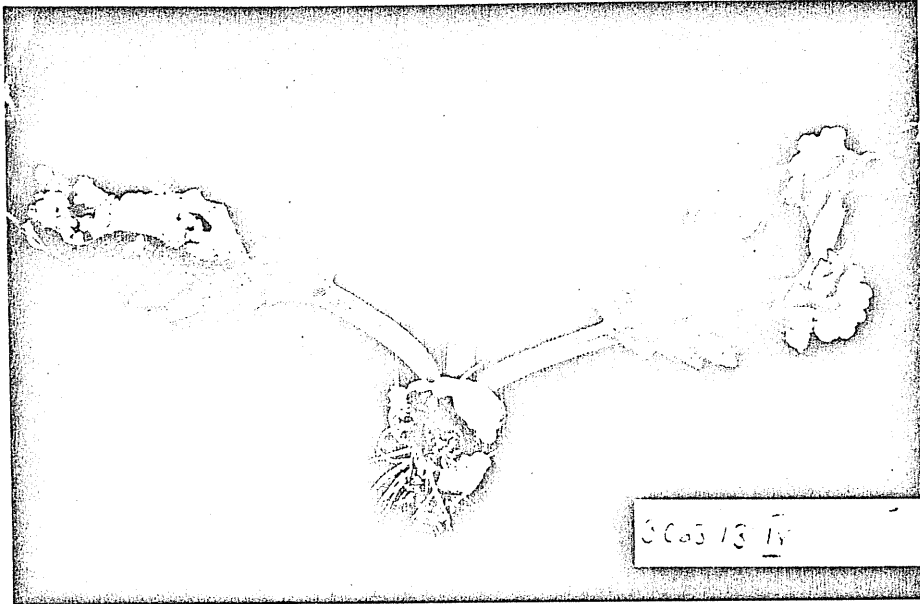
## 2) TRANSKONJUGATION AUF FESTEM MEDIUM:

$10^8$  Donorbakterien (*A. tumefaciens* Stamm B6-806) und  $10^7$  Rezipientenbakterien (3Co3) wurden vermischt und auf Bakterienfilter (Sartorius, Porengröße 0,15  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Die Filter mit Donor und Rezipienten-Gemisch wurden auf Platten mit einem synthetischen Medium (nach Kerr et al. 1977) mit 2 % Agar, 2 g/l Octopin und Vitaminen (Lippincott et al. 1973) für 7 Tage bei 27°C inkubiert. Nach 7 Tagen wurde das Donor-Rezipienten-Gemisch auf den Filtern in 4 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert, 1000-fach verdünnt und auf Selektivagar (NB/10 mit 2 % Agar, 1000  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 3  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin) plattiert. Unter den antibiotika-resistenten Kolonien wurden 220 Kolonien zufällig ausgewählt und auf ihre Virulenz an Kalanchoe-Pflanzen geprüft. Von diesen 220 Kolonien erwiesen sich 52 als virulent. Sie induzierten an

Kalanchoe-Blättern und Sprossen Tumorbildung, nicht Wurzelbildung wie *A. rhizogenes* 15834. Alle diese 52 Kolonien wurden zuerst den Tests auf Produktion von Ketolactose und Verwertung von Citrat unterworfen. Alle waren Ketolactose negativ und verwendeten Citrat basisch. Mit 31 zufallsgemäß gewählten Kolonien wurden alle biologischen und biochemischen Tests zur genaueren Identifizierung der Bakterien durchgeführt.



Tumorinduktion durch 3Co3-4-IV, einen Transkonjugant, an *Kalanchoe daigremontiana*. (8 Wochen alt)



Tumorinduktion durch 3003-13-IV, einen Abkömmling von *A. rhizogenes* 15834, der spontan avirulent geworden war, und durch Konjugation die Fähigkeit zur Tumorbildung von *A. tumefaciens* B6-806 erworben hat. (8 Wochen alt)

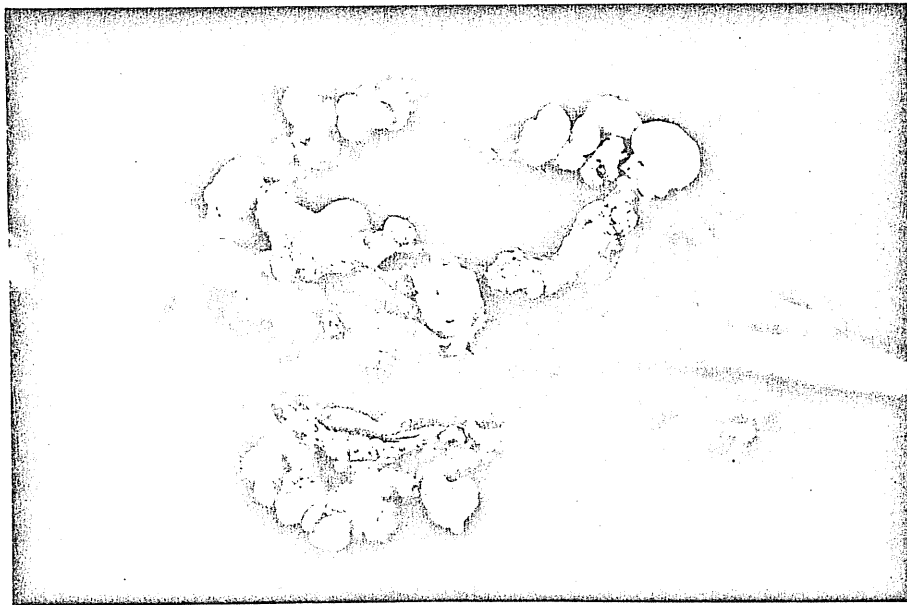


TABELLE : III

<u>Bakterien-Stämme</u>		Alle andere	
A. rhizogenes	A. tumefaciens	3Co3-12	30 Isolate.
15834	B6-806	T	T
Virulenz	W	T	T
Ketolactoseprodukt.	-	+	-
Citratverwertung	b	s	b
Agrocin 84-Empfindl.	+	-	-
Ausbreitung auf Weich.	-	+	-
Empfind. für Phagen PS8	-	+	-
Wachstum bei 35°C	-	+	-
Antibiotika-Resistenz.	-	-	+
Lackmusmilch-Reaktion	rosa	braun	rosa

W= Wurzelbildung, T= Tumorbildung, s= Sauer, b= Basisch.

Damit war es möglich, ein avirulentes, ehemals wurzelbildendes *A. rhizogenes* in ein *A. tumefaciens*, das Tumoren bildet, zu verwandeln. Ein hoher Anteil von 23,6 % aller antibiotika-resistenten Kolonien waren echte Transkonjuganten.

#### D) STUDIUM EINIGER BEDINGUNGEN DER VIRULENZÜBERTRAGUNG.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war das Studium von Bedingungen, die eine optimale Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* ermöglichen. Besonders interessierten mich die Wirkungen verschiedener Substanzen, die entweder dem Octopin nahe stehen oder dessen Bausteine sind, auf diesen Vorgang.

##### 1) MEDIENKONSISTENZ:

Bisher waren alle in vitro Transkonjugationsexperimente auf festem Medium durchgeführt worden. (Kerr 1977, Genetello et al. 1977). Dabei besteht vielfach Kontaminationsgefahr. Aus diesen Gründen habe ich dieses Experiment zum ersten Mal mit Agrobakterien in flüssigem, Octopinhaltigem Medium gleicher Zusammensetzung wie festes Medium durchgeführt. Es hat sich gezeigt, daß die Virulenzübertragung genauso gut im flüssigem Medium stattfindet wie auf dem festen Medium.

Der Einfluß der Medienkonsistenz auf die Häufigkeit der Virulenzübertragung, kombiniert aus allen Experimenten mit gelungener Transkonjugation:

Tabelle IV:

	Festes Medium	Flüssiges Med.
Zahl geprüfter Kolonien	1416	2384
Zahl der Transkonjugant.	161	458
% - Transkonjuganten.	11,37	19,21

2) EINFLUSS VON OCTOPIN UND OCTOPINVERWANDTEN SUBSTANZEN AUF VIRULENZÜBERTRAGUNG:

Bei Plasmidübertragungsexperimenten zwischen *A. tumefaciens*-Stämmen *in vitro* ist Octopin im Medium unerlässlich. (Kerr 1977, Genetello et al. 1977, Hooykaas, P.J.J. 1979, A.Petit et al. 1978). Ob Octopin auch bei Virulenzübertragungsexperimenten bei *A. rhizogenes* unerlässlich ist, oder seine Vorstufen oder verwandten Substanzen Octopin ersetzen können, wurde untersucht.

Verwendet wurden;

a) Vorstufen von Octopin:

1) Arginin

2) Pyruvat.

b) Octopinverwandte Substanzen:

1) Agmatin

2) Carnosin.

Carnosin ist ein Tumorwachstumsfaktor wie Octopin.

(Lippincott and Lippincott 1970 a).

Diese Substanzen wurden statt Octopin oder in Kombination mit Octopin dem Transkonjugationsmedium zugesetzt.

In weiteren Experimenten wurde auch die Octopin-Konzentration im Medium BM + V variiert.

Tabelle  $\sqrt{V}$  : Der Einfluß von Octopin und verwandten Substanzen auf die Häufigkeit der Virulenzübertragung: (In flüssigem Medium).

Zusatz zum Medium	R:D	Untersuchte Kolonien	Zahl der Transkonj.	%- der Trans.	Exp.
BM + V					
-	1:10	112	-	-	1
Octopin(2)	1:10	552	74	13,4	5
Octopin(2)	1:1	472	118	25	6
Carnosin(2)	1:10	104	-	-	1
Agmatin(2)	1:10	-	-	-	2
Pyruvat(2)	1:10	112	-	-	2
Arginin(2)	1:10	144	-	-	2
Oct.+Pyr. (2/2)	1:10	304	141	46,38	5
Oct.+Arg. (2/2)	1:10	-	-	-	1
Oct.+Arg. (2/1)	1:10	48	3	6,25	1
Oct.+Car. (2/2)	1:10	256	76	29,68	4
Oct.+Agm. (2/2)	1:10	280	46	16,4	4

R:D= Rezipient : Donor-Verhältnis.

Exp.= Zahl der durchgeführten Experimente.

( )= Konzentrationen der verwendeten Substanzen in mg/ml.

Tabelle VI : Einfluß der Octopin-Konzentration im Konjugationsmedium auf die Virulenzübertragung:

Octopin-Zusatz zum Medium	Zahl der Untersuchten Kolonien	Zahl der Transkon- juganten	Exp.
BM + V			
1 g/l .	112	4	2
0,5 g/l	96	-	2
0,1 g/l	48	-	1
0,05 g/l	48	-	1

Tabelle zeigt, daß für eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* mindestens 1 g/l Octopin im synthetischen Medium erforderlich ist.

Tabelle VII: Der Einfluß von Octopin und verwandten Substanzen auf die Häufigkeit der Virulenzübertragung auf festem Medium:

Zusatz zum Medium	R:D	Zahl der Kolonien	Zahl der Transkon- juganten	% = der Transkon- juganten	Exp.
-	1:10	216	-	-	2
NB/10	1:10	80	-	-	1
Octopin(2)	1:10	220	52	23,6	2
Octopin(2)	1:1	16	1	6,25	1
Octopin(2)	10:1	112	15	13,39	1
Arginin(2)	1:10	112	-	-	1
Carnosin(2)	1:10	100	-	-	1
Agmatin(2)	1:10	-	-	-	1
Pyruvat(2)	1:10	240	-	-	2
Oct+Arg. (2/2)	1:10	-	-	-	1
Oct+Pyr. (2/2)	1:10	144	33	22,9	3
Oct+Car. (2/2)	1:10	80	58	72,5	1
Oct+Agm. (2/2)	1:10	96	2	2,03	1

R:D= Rezipienten-Donor-Verhältnis.

Exp.= Zahl der durchgeführten Experimente.

( )= Konzentrationen der verwendeten Substanzen in mg/ml.

Aus den Tabellen geht hervor, daß Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* ;

a) auf Basalmedium ohne Octopin und auf Vollmedium sogar auch mit 2 g/l Octopin nicht möglich ist.

b) an Gegenwart von Octopin gebunden ist, und Octopin durch seine Bausteine oder verwandten Substanzen nicht ersetzt werden kann.

c) am häufigsten bei folgenden Kombinationen stattfindet:

1) Octopin( 2 mg/ml ) + Pyruvat( 2 mg/ml )

2) Octopin( 2 mg/ml ) + Carnosin( 2 mg/ml ).

Bei zwei Kombinationen( Octopin(2) + Arginin(2) in BM + V und Agmatin(2 mg/ml) in BM + V ) konnten nach 7-tägiger Inkubation im Brutschrank bei 27°C keine antibiotika-resistente  $\beta$ Co $\beta$  mehr auf dem Selektivagar (NB/10 + 2 % Agar mit 1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin) isoliert werden, obwohl beide Stämme, *A. tumefaciens* Stamm B6-806 und *A. rhizogenes*-Derivate  $\beta$ Co $\beta$  allein, in diesen Medien wachsen. Deshalb habe ich einen Antibioagramm-Test durchgeführt. *A. tumefaciens* Stamm B6-806 wurde ins;

BM + V + Octopin(2 mg/ml) + Arginin(2 mg/ml) und

BM + V + Agmatin(2 mg/ml) gegeben und bei 27°C im

Brutschrank 7 Tage inkubiert. Nacher wurden die Bakteriensuspensionen abzentrifugiert und Überstände auf Bakterienfilter(Porengröße 0,15  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Sterile Papierscheibchen(0,5 cm  $\emptyset$ ) wurden mit diesen Kulturfiltratengesättigt und auf NB + Agar-Platten plattiert. Auf die Platte war eine dichte Suspension von 3Co3 plattiert worden.

Nach zwei-tägiger Inkubation bei 27°C zeigten sich um die Papierscheibchen Hemmhöfe mit einer Breite von 2-3 mm.

In Gegenwart von Octopin(2 mg/ml) und Arginin(2 mg/ml) im BM + V oder Agmatin(2 mg/ml) im BM + V produziert offenbar *A. tumefaciens* Stamm B6-806 Substanzen, die 3Co3 töten.

### 3) VERSTÄRKTE WIRKUNG VON OCTOPIN IN GEGENWART VON PYRUVAT:

Da sich gezeigt hatte, daß Zusatz von Pyruvat zum Octopin die Häufigkeit der Virulenzübertragung verbessern kann, habe ich das Verhältnis beider Substanzen zueinander variiert. Es wurden dem BM + V mit 2 mg/ml Pyruvat verschiedene Mengen von Octopin angesetzt und Bakterien in einem 1:10 (R:D)-Verhältnis bei 27°C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle VIII : Verstärkte Wirkung von Octopin in Gegenwart von Pyruvat:

Zusatz zum BM + V mit 2 g/l Pyruvat.	Zahl der untersuchten Kolonien	Zahl der Transkon- juganten	% - der Transkon- juganten	Exp.
Octopin(2 g/l)	48	32	66,66	1
Oct.(0,5 g/l)	96	30	31,25	2
Oct.(0,1 g/l)	80	20	25	2
Oct.(0,05 g/l)	96	11	11,4	2
Oct.(0,01 g/l)	48	-	-	1

Damit ist klar(vergl. Tabelle VIII mit Tabelle VI), daß Pyruvat die Virulenzübertragung nicht nur in Gegenwart hoher Octopin-Konzentrationen verbessert, sondern auch bei niedrigen Octopin-Konzentrationen eine Virulenzübertragung ermöglicht, was sicher bei Virulenzübertragung in planta von großer Bedeutung ist.

#### 4) EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE HÄUFIGKEIT DER VIRULENZÜBERTRAGUNG:

Nach allen Experimenten zur Untersuchung der Virulenzübertragung blieb noch die Frage offen, ob diese Virulenzübertragung auch bei niedrigeren bzw. hö-

heren Temperaturen, d. h. außerhalb des Optimal-Bereiches(27°C), möglich ist? Dieser Frage wurde zweimal bei 32°C, dreimal bei 20°C nachgegangen.

Donor-Rezipienten-Gemisch im Verhältnis von 1:10(R:D) wurde dem Medium BM + V + 2 g/l Octopin gegeben und bei 32°C bzw. bei 20°C 7 Tage inkubiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurden Kultursuspensionen 10<sup>3</sup>-fach verdünnt und Bakterien auf Selektivagar(NB/10 + 2 % Agar mit 1000 ug/ml Streptomycin und 3 ug/ml Gentamycin) plattiert. Unter den antibiotika-resistenten Kolonien wurde nach Transkonjuganten gesucht.

Tabelle IX: Einfluß der Temperatur auf Virulenzübertragung:

<u>Temperatur</u>	<u>Untersuchte Kol.</u>	<u>Zahl der Transk.</u>	<u>%-Transk.</u>
32°C	144	10	6,94
20°C	192	-	-

Aus der Tabelle geht hervor, daß niedrige Temperaturen für eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* schlechtere Bedingungen darstellen als höhere Temperaturen.

##### 5) TRANSKONJUGATION UND BAKTERIENWACHSTUM:

Bei *A. tumefaciens* ist Plasmidübertragung in einem Vollmedium( wie z.B. NB) nicht möglich. Vermutlich sind in einem Vollmedium einige Aminosäuren vorhanden, die eine Plasmidübertragung total unterdrücken. ( wie L- und D- Methionin, L-Cystein und L-Cystin) (Hooykaas et al. 1979). Das bedeutet aber nicht, daß Bakterienwachstum und Virulenzübertragung sich ausschließen.

Bei meinen Untersuchungen habe ich festgestellt, daß auf einem vollsynthetischen Medium(hier BM + V) mit Octopin und mit zusätzlichen Substanzen wie Pyruvat die Häufigkeit der Virulenzübertragung durchaus vom Wachstum der Bakterien abhängt. Werden nämlich in flüssigem Medium Virulenzübertragungsversuche durchgeführt, gehen gutes Wachstum und hohe Häufigkeit der Virulenzübertragung parallel.

Tabelle  $\bar{X}$  : Abhängigkeit der Virulenzübertragung  
von gutem Wachstum der Bakterien:

Zusatz zum Medium Suspensionsdichte % - Virulenzüber-

BM + V	E=660 nm.	tragung.
Oct.+Pyr. (2/2)	0,59	66,6
Oct.+Pyr. (0,5/2)	0,46	31,25
Oct.+Pyr. (0,1/2)	0,25	25,0
Oct.+Pyr. (0,05/2)	0,2	11,4
Oct.+Pyr. (0,01/2)	0,135	0

( ) = Konzentrationen verwendeter Substanzen in mg/ml.

E) ÜBERTRAGUNG DER FÄHIGKEIT ZUR TUMORINDUKTION VON  
A. TUMEFACIENS AUF WURZELINDUZIERENDE A. RHIZOGENES:

Die beschriebenen Experimente zur Virulenzübertragung waren mit einem virulenten Stamm von *A. tumefaciens* (B6-806) als Donor und mit einem avirulenten Stamm von *A. rhizogenes* (3Co3) als Rezipient durchgeführt worden. Zwischen diesen beiden ist Virulenz austauschbar.

Das wirft sofort das Problem auf, ob Virulenzen, die sich unterschiedlich ausdrücken (Wurzelbildung, Tumorbildung) auch in einem Bakterium vereint werden können. In abschließenden Experimenten zur Erklärung der Bedingungen für Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* wurde auch dieser Frage nachgegangen.

*A. rhizogenes* 15834 wurde gegen Streptomycin (1000 µg/ml) und Gentamycin (3 µg/ml) auf NB/10 mit 2 % Agar plattiert. Eine resistente Kolonie wurde gewählt und auf Virulenz geprüft. Sie war virulent. Diese virulente, antibiotika-resistente Mutante von *A. rhizogenes* 15834 (15834-R) wurde dann mit *A. tumefaciens* Stamm B6-806 in flüssigem Medium (BM + V) mit 2 g/l Octopin zur Konjugation gebracht. (bei 27°C im Brutschrank). Nach 7-tägiger Inkubation wurde das Donor-Rezipienten-

Gemisch  $10^3$ -fach verdünnt und auf Selektivagar(NB/10 mit 1000 ug/ml Streptomycin, 3 ug/ml Gentamycin und 2 % Agar) plattiert. Nach drei Tagen wurden auf dem Selektivagar 48 antibiotika-resistente Kolonien zufallsgemäß ausgewählt und auf ihre Virulenz an Kalanchoe-Blättern geprüft.

Unter diesen 48 Kolonien induzierte eine Kolonie (Nr.28) rauhe Tumoren mit kurzen und dicken Wurzeln, während die anderen 47 Kolonien nur Wurzelinduktion wie Rezipient-Stamm 15834-R hervorriefen. Bakterien aus dieser Kolonie (15834-R-28) wurden dreimal auf NB + Agar subkloniert und bei dritten Mal wurden 24 Subklone zufällig ausgewählt und auf ihre Virulenz an Kalanchoe-Blättern und Sprossen untersucht. Alle zeigten gleichzeitige Wurzel + Tumor-Induktion.

Sie hatten damit die ganz unterschiedlichen Tumor-Eigenschaften ihrer Elternstämme in sich zusammengebracht und zeigten Tumor- und Wurzelinduktion zugleich.

In biologischen und biochemischen Tests verhalten sich diese Transkonjuganten außer in ihren Tumoreigenschaften genauso wie *A. rhizogenes* 15834.

Tabelle XI: Übertragung der Virulenz von tumorinduzierendem A. tumefaciens auf wurzelinduzierende A. rhizogenes:

Bakterien-Stämme

Tests A. rhizogenes 15834 A. tumef. B6-806 15834-R-28

Virulenz	W	T	W + T
Ketolactoseproduktion	-	+	-
Citratverwertung	b	s	b
Empfindlichkeit für PS8	-	+	-

W= Wurzelbildung, T= Tumorbildung.

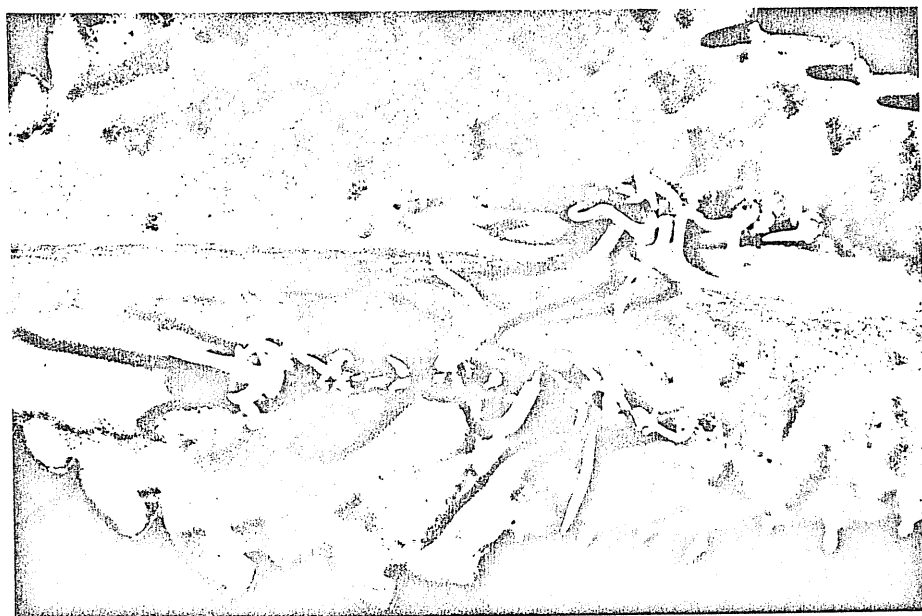
b= Basisch, s= Sauer.

15834-R-28 ist antibiotika-resistente, Wurzel- und Tumorinduzierende Derivate von A. rhizogenes 15834.

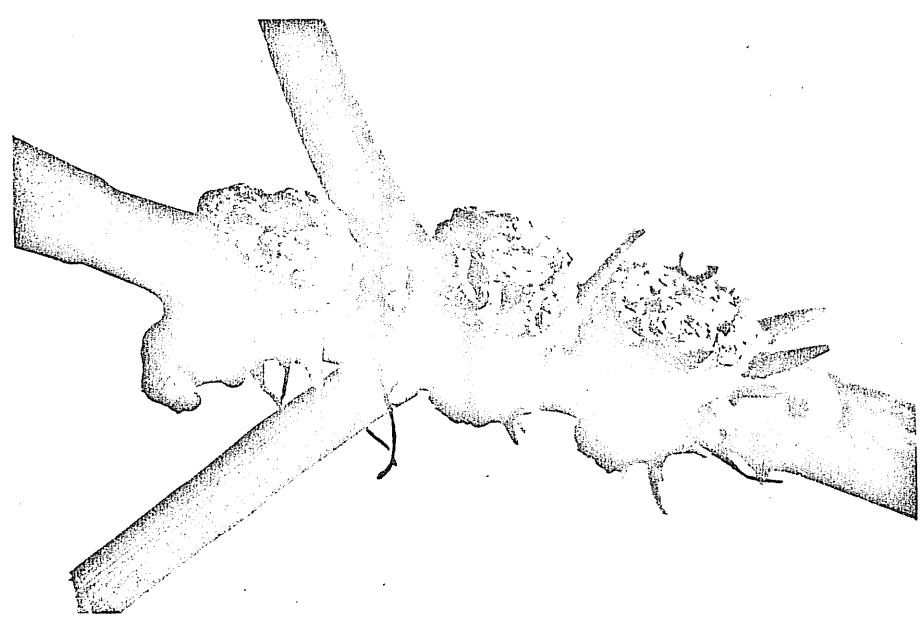
Pahe<sup>e</sup>g<sup>e</sup>resistenz (sehr spezifische Reaktion), fehlende Ketolactose-Produktion und Citratverwertung charakterisieren diesen 15834-R-28 und seine 24 Subklone als A. rhizogenes 15834-Abkömmlinge, Tumorbildung zeigt A. tumefaciens an. Somit sind beide Eigenschaften in einem Bakterium vereinbar.



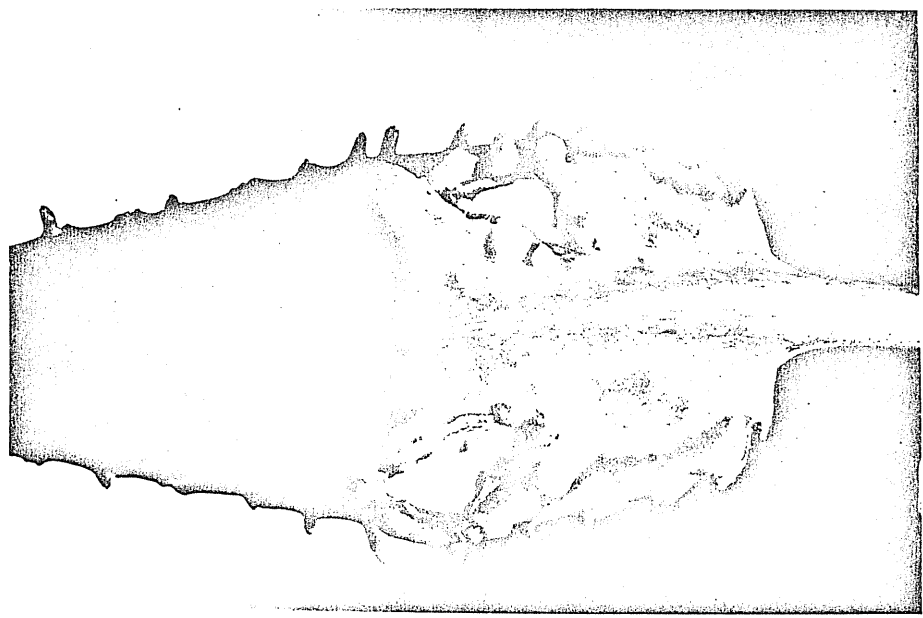
Durch 15834-R erzeugte Wurzelinduktion am Kalanchoe  
-Blatt. (5 Wochen alt.)



Durch A. rhizogenes 15834 induzierte Wurzelbildung  
am Kalanchoe-Blatt. (4 Wochen alt).



Durch *A. tumefaciens* B6-806 induzierte Tumoren  
am Kalanchoe-Sproß(4 Wochen alt.).



Tumorbildung am Blatt von *Kalanchoe daigremontiana*,  
(vier Wochen alt) induziert durch *A. tumefaciens*  
Stamm B6-806.

DISKUSSION:I) VIRULENZ, VIRULENZELIMINATION UND VIRULENZVERLUST:

Virulenz, Empfindlichkeit für Agrocin 84, Fähigkeit zum Abbau von Octopin und/oder Nopalin, und Ausschluß des Phagen AP1 sind Eigenschaften von *A. tumefaciens*, die genetisch streng miteinander gekoppelt sind. Ihre genetische Information ist auf einem sog. TI-Plasmid lokalisiert. (Hamilton and Fall 1971, Hooykaas et al. 1979, Engler et al. 1975). Geht eine dieser Eigenschaften verloren, so bedeutet das in der Regel, daß auch die anderen verschwunden sind, was gleichzeitig das Verschwinden des TI-Plasmids bedeutet. (Engler et al. 1975, Genetello et al. 1977). Inzwischen wurde aber nachgewiesen, daß bei *A. tumefaciens* auch bereits Eliminierung eines Teils des Plasmids von 120 Megadaltons durch Temperaturbehandlung bei 37°C (TI-Plasmid-curing) oder durch Kultivierung der Bakterien in Gegenwart von EBr. zu Virulenzverlust führen kann. (Bor-Chian and Kado-1977). Solche avirulenten Derivate besitzen noch ein Rest-Plasmid von 70-85 Megadaltons. Ein solches avirulentes Bakterium ist weiterhin in der Lage, ein zweites Plasmid aufzunehmen. (Bor-Chian und Kado. 1977).

Eine dauerhafte Virulenz-, bzw. Plasmideliminierung ist beim nahe verwandte *A. rhizogenes* 15834 durch Behandlung mit Acridinorange, Acriflavin und EBr. nicht zu erzielen.

Diese Farbstoffe sind aber in entsprechenden Konzentrationen in der Lage, die Fähigkeit des virulenten *A. rhizogenes* 15834 zur Transformation der Pflanzenzellen vorübergehend zu eliminieren.

Eine solche Verhinderung der Transformation der Pflanzenzellen kann durch folgende Hypothese erklärt werden:

Aminoacridine (z.B. Acridinorange=2:8-bis-Dimethylaminoacridin und Proflavin=2:8-diaminoacridin) binden durch Interkalieren an die DNS und verursachen dadurch einerseits eine Hemmung der DNS-Replikation, andererseits die Inhibition der m-RNS-Synthese in Bakterien. (Wolfe, A.D. et al. 1971).

Die Wirkung von EBr. entspricht der Wirkung von Proflavin. Dieser Farbstoff hemmt bei *E. coli* die DNS- und RNS-Synthese zugleich. (Waring, M.J. 1966), indem sich EBr. (wie Nitroacridine) einerseits an DNS und RNS bindet, wodurch die DNS-abhängige DNS-Polymerase I-Reaktion stark und RNS-Polymerase-Reaktion erheblich gestört werden, andererseits inhibiert EBr. die Bindung von Phenylalanin an Ribosomen. (Wolfe, A.D. et

al. 1971).

Acriflavin hemmt die RNS-Synthese in Rattenleberzellen sogar bei niedrigen Konzentrationen. (Saccone, C. et al. 1969). Auch Acriflavin (wie EBr.) läßt bei Hefe Mutanten entstehen, die keine Cytochromoxydase mehr besitzen und deren Mitochondrien keine Proteine mehr synthetisieren können. (Kuzela, S and Grecna, E. 1969).

In meinen Untersuchungen kann die Wirkung von Acridinen bzw. von EBr. über die Eliminierung der Virulenz von *A. rhizogenes* 15834 so erklärt werden, daß ein in seinen lebenswichtigen Proteinen gestörtes *A. rhizogenes* 15834 solange nicht in der Lage ist, die Pflanzenzellen zu transformieren, bis der Schaden behoben ist.

Die Beseitigung des durch Acridine bzw. EBr. entstandenen Schadens dauert offenbar in planta länger als auf einem Vollmedium. Deshalb wird die Zeit überschritten, in der die Pflanzenzellen für eine eventuelle Transformation bereitstehen. Somit kommt keine Wurzelinduktion zustande.

Auf jeden Fall gilt, daß die Wirkung dieser Farbstoffe innerhalb einer 24-stündigen Inkubation auf einem Vollmedium total aufgehoben wird und Bakterien ihre Virulenz wieder erhalten.

VIRULENZ-, BZW. PLASMIDVERLUST:

Spontaner Verlust der Virulenz ist bei *A. rhizogenes* 15834 nicht mit dem Verlust der bei *A. tumefaciens* mit der Virulenz streng gekoppelten Eigenschaften, wie Agrocin 84-Empfindlichkeit, Fähigkeit zum Octopin und/oder Nopalin, verbunden.

Anders formuliert;

Resistenz gegen Agrocin 84 bedeutet bei *A. rhizogenes* 15834 nur selten (weniger als 7 % einer Bakterienpopulation) den Verlust der Virulenz und gar nicht den Verlust der Fähigkeit zum Abbau von Octopin.

Versucht man, die Lokalisation der Eigenschaften wie Virulenz, Agrocin 84-Empfindlichkeit und Fähigkeit zum Octopinabbau bei *A. rhizogenes* 15834 zu verstehen, so lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

1) *A. rhizogenes* 15834 besitzt mehr als ein Plasmid, wobei die drei Eigenschaften auf verschiedenen Plasmiden lokalisiert sind:

Dann müßte das Plasmid mit Informationen für;

- a) die Virulenz nur selten mutieren oder verlorengelien.
- b) die Agrocin 84-Empfindlichkeit am meisten mutieren oder verlorengelien.
- c) den Octopinabbau nie mutieren oder verlorengelien.

2) Alle Eigenschaften sind auf ein Plasmid und demselben Plasmid lokalisiert:

Dieses Plasmid erfährt häufig eine Mutation (z.B. Deletion) der Gene, die die genetische Information für Agrocin 84-Empfindlichkeit tragen, und von dieser Mutation bleiben die Gene, die wichtig für Virulenz sind, unberührt.

Die Region, worauf die Information für Octopinabbau lokalisiert ist, bleibt auf jeden Fall verschont.

Nach einer Mutation des Plasmids, in der Virulenzregion enthält das damit avirulentgewordene Bakterium denjenigen Teil des Plasmids immer noch, der die Octopinregion besitzt. Deshalb sind avirulente Derivate von *A. rhizogenes* 15834 weiterhin in der Lage, Octopin abzubauen. Der immer noch im Bakterium vorhandene Teil des Plasmids (TI-Plasmids) verhindert die Aufnahme eines zweiten Plasmids nicht!

Nach dieser Vorstellung könnten die Gene für alle drei Eigenschaften auf dem Plasmid wie folgt geordnet sein. Im Gegensatz zum Octopin-TI-Plasmid von *A. tumefaciens* B6-806 (Hooykaas et al. 1979) müssen die Gene, die die Information für die Fähigkeit zum Octopinabbau tragen, nicht dicht neben den Genen, die wichtig für Virulenz sind, stehen, sondern voneinander weit entfernt lokalisiert sein.

Die Gene, die die Information für Agrocin 84-Empfindlichkeit tragen, dürften dann auf einer Stelle lokalisiert sein, die der Virulenzregion nahe liegt.

3) Fähigkeit zum Octopinabbau ist nicht auf dem Plasmid lokalisiert:

In diesem Fall dürften die anderen Eigenschaften unabhängig von der Fähigkeit zum Octopinabbau mutieren oder verlorengelangen, d.h. folgende Rekombinationen möglich sein:

- a) Agrocinempfindliche, virulente Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau von Octopin. (Wild Typ von *A. rhizogenes* 15834)
- b) Agrocinresistente, virulente Bakterien mit der Fähigkeit zum Octopinabbau. (Diese Rekombinanten sind am häufigsten zu finden).
- c) Agrocinresistente, avirulente Bakterien mit der Fähigkeit zum Abbau von Octopin. (Selten).

Die 3. Hypothese beschreibt das Verhalten des *A. rhizogenes* 15834 am besten.

Versuche zur molekularbiologischen Bestätigung sind in Zusammenarbeit mit einer anderen Arbeitsgruppe geplant.

## II) VIRULENZÜBERTRAGUNG:

Unter Bedingungen, die eine Virulenzübertragung zwischen einem avirulenten Stamm und einem virulenten Stamm von *A. tumefaciens* erlauben, findet eine Virulenzübertragung auch von *A. tumefaciens* B6-806 auf *A. rhizogenes* 15834 statt.

Die Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* läßt sich im flüssigen Medium genauso ermöglichen wie auf festem Medium, und im flüssigen Medium ist dieser Vorgang sogar leichter durchzuführen. Gegenwart von Octopin im Konjugationsmedien ist auch für eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* unentbehrlich.

Nach einer gelungenen Virulenzübertragung zeigen die Transkonjugante dieselben Tumoreigenschaften wie der Donorstamm, also bei wurzelinduzierendem Donor wird der Rezipient zum Wurzelinduzierenden, bei tumorinduzierendem Donor wird der Rezipient zum Tumorinduzierenden. Das bakterielle Chromosom des wurzelinduzierenden Stammes trägt nicht zur Virulenz und zur Form der Virulenz bei. Avirulente Derivate des wurzelinduzierenden *A. rhizogenes* 15834 können in ein tumorinduzierendes Bakterium umgewandelt werden, ohne dabei von der Fähigkeit zur Wurzelinduktion ihres Elternstammes etwas zu zeigen.

Offenbar ist sowohl Virulenz als auch die Art der Virulenz (Tumorinduktion, Wurzelinduktion) plasmidkodiert.

### III) BEDINGUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER VIRULENZÜBERTRAGUNG:

Es steht fest, avirulenter *A. rhizogenes* 15834 unter Bedingungen, die für eine Virulenzübertragung günstig sind (Basalmedium mit 2 g/l Octopin), immer bereit ist, durch Konjugation vom virulenten *A. tumefaciens* B6-806 dessen TI-Plasmid aufzunehmen.

Diese Virulenzübertragung verlangt unbedingt die Gegenwart von Octopin im Konjugationsmedium. Die Bausteine des Octopins allein oder verwandte Substanzen von Octopin fördern keine Virulenzübertragung. Es wurde nachgewiesen, daß Octopin die Synthese der Octopinabbauenden Enzyme stimuliert und die Übertragung des TI-Plasmids erhöht. (Klapwijk, P.M. 1979). Die Übertragung der Virulenz bei *A. tumefaciens* ist koordiniert mit dem Octopinabbau, und Octopin, Octopinsäure und Lysopin können den Octopinabbau induzieren, während Arginin auf den Abbau von Octopin kaum Einfluß hat. (Klapwijk, P.M. 1979).

Die zur Konjugationsförderung benötigte Octopinmenge kann jedoch durch Zusatz von 2 g/l Pyruvat drastisch

reduziert werden (20-fach weniger Octopinbedarf), um etwa die gleiche Prozentzahl von Transkonjuganten zu erzielen.

2 g/l Carnosin mit 2 g/l Octopin im Konjugationsmedium läßt die Zahl der Transkonjuganten um das Zweibis Dreifache steigen.

Offenbar stimulieren diese beiden Substanzen den Abbau von Octopin, und es lassen sich dadurch höhere Zahlen von Transkonjuganten erzielen.

Die Temperatur scheint bei der Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* eine wichtige Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu den mit *A. tumefaciens* erzielten Ergebnissen (Hooykaas 1979) sind niedrigere Temperaturen ungünstiger als höhere Temperaturen für eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes*. Bei 32°C wird die Tumorinduktion an *K. daigremontiana* stark gehemmt (Braun und Mandle 1948). *A. rhizogenes* 15834 kann bei 35°C nicht mehr wachsen. Trotz dieser ungünstigen Einflüsse der hohen Temperatur findet jedoch eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* auch bei 32°C statt. Bei 20°C wurde dagegen keine Virulenzübertragung erzielt. Das könnte dadurch erklärt werden, daß

sich die Zahl der Donorbakterien bei 32°C gegenüber der Zahl der Rezipientenbakterien zu stark erhöht, weil *A. tumefaciens* B6-806 bei dieser Temperatur un-  
verhindert weiter wächst, und damit wird das Donor-  
Rezipientenverhältnis erheblich geändert, das die  
Virulenzübertragung womöglich günstig beeinflussen  
könnte.

Andererseits ist vielleicht möglich, daß der Octopin-  
abbau bei 20°C verlangsamt oder gar zum Stehen ge-  
kommen ist, wobei die Virulenzübertragung sicher ne-  
gativ beeinflußt wird.

#### IV) ÜBERTRAGUNG DER VIRULENZ VON A. TUMEFACIENS AUF DEN VIRULENTEN A. RHIZOGENES:

Eine Übertragung der Virulenz vom *A. tumefaciens*  
B6-806 (im Besitz der Fähigkeit zur Tumorinduktion)  
auf *A. rhizogenes* 15834 ist auch dann möglich, wenn  
der Rezipient virulenz ist. (die Fähigkeit zur Wurzel-  
induktion noch besitzt).

Es ist also nicht von Bedeutung, ob der als Rezipient  
verwendete *A. rhizogenes* 15834 während eines solchen  
Konjugationsvorgang sein eigenes Plasmid noch ent-  
hält oder vorher avirulent geworden ist.

Wird das TI-Plasmid eines virulenten *A. tumefaciens*-  
stammes auf einen virulenten *A. rhizogenes* übertragen,

so macht es sich dadurch bemerkbar, daß der wurzelin-  
duzierende A. rhizogenes nunmehr Tumoren(unorganisiert)  
mit Wurzelanlagen(organisiert) an Kalanchoepflanzen  
hervorruft.

Ob dieses Ereignis auch in umgekehrtem Sinn genauso  
auftreten würde, ist sicher untersuchenswert.

ZUSAMMENFASSUNG:

In der vorliegenden Arbeit wurden *A. rhizogenes* 15834, ein wurzelinduzierender Agrobacteriumstamm, und *A. tumefaciens* B6-806 durch Virulenz an *Kalanchoe daigremontiana* und eine Reihe von biochemischen und physiologischen Eigenschaften, die z.T. mit der Virulenz im Zusammenhang stehen, charakterisiert. Durch Behandlung der Bakterien mit Acridinorange, Acriflavin oder Ethidiumbromid konnte aus *A. rhizogenes* die Virulenz nicht eliminiert werden. Ein avirulentes Derivat von *A. rhizogenes* wurde durch Selektion gegen Agrocin-84 isoliert und bei in vitro Virulenzübertragungsversuchen als Rezipient verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß in vitro die Virulenz vom tumorinduzierenden *A. tumefaciens* auf avirulentes *A. rhizogenes* übertragen werden kann. Das ursprünglich wurzelinduzierende Bakterium ruft nun Tumoren hervor. Genau wie bei Virulenzübertragungen zwischen verschiedenen Stämmen von *A. tumefaciens* (Kerr 1977, Genetello et al. 1977) ist Octopin im Konjugationsmedium unentbehrlich. Vorstufen von Octopin, wie Pyruvat oder Arginin, und dem Octopin verwandte Substanzen, wie Agmatin oder Carnosin, allein fördern keine Virulenzübertragung. Die für eine Konjugation benötigte Octopinmenge kann jedoch durch Zusatz von Pyruvat stark verringert werden. Erstmals wurde die in vitro Virulenzübertragung bei Agrobakterien in flüssigem Medium durchgeführt und der gleiche Erfolg, wie auf festem Medium, erzielt. Eine Virulenzübertragung von *A. tumefaciens* auf *A. rhizogenes* ist auch bei Verwendung von virulentem *A. rhizogenes* als Rezipient möglich. Resultat ist in diesem Fall ein Bakterium, das die Fähigkeit zur Tumorinduktion und die Fähigkeit zur Wurzelinduktion miteinander verbindet. Während die Eigenschaften, die Fähigkeit zum Octopinabbau, Agrocin-84-Resistenz, bei *A. tumefaciens* streng mit der Virulenz gekoppelt sind, liegen sie bei *A. rhizogenes* nur ein wenig stark gekoppelt vor.

LITERATUR:

- Adams, M.H., 1959: Bacteriophages. Publ. New York.
- Albinger, G., 1976: Diplomarbeit. Bot. Ins. Univ.HD.
- Albinger, G. und R. Beiderbeck, 1977: Übertragung der Fähigkeit zur Wurzelinduktion von *A. rhizogenes* auf *A. tumefaciens*. Phytopath. Z. 90, 303-310.
- Appel, O., H. Richter., 1956: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Zweiter Band, Sechste Aufl. "Die Virus- und bakteriellen Krankheiten." Paul Parey-Verlag. Berlin und Hamburg.
- Beiderbeck, R., 1970: Untersuchungen an Crown-Gall I. Z. Naturforschg. 25 b, 407-411.
- --, 1973: Unabhängige Induktion von Teratomen und Wurzeln durch Mischungen verschiedener Stämme von *Agrobacterium*. Z. Pflanzenphysiol. 69, 163-167.
- --, und Müller, R., 1974: Die Entwicklung von *Agrobacterium*-induzierten Wurzel an Blättern. Z. Pflanzenphysiol. 71, 154-162.
- --, 1977: "Pflanzentumoren". Ulmer-Verlag. Stuttgart.
- --, 1973 b: Bakterienwand und Tumorinduktion durch *A. tumefaciens*. Z. Naturforschg. 28 c, 198-201.
- --, 1976: Kontakt von *Agrobacterium* mit Wundrandzellen als Vorbedingung für eine Tumorinduktion. Z. Naturforschg. 31 c, 317-318.

-- --, und R. Hohl., 1979: Die Ausbreitung von Agrobacterium-Stämmen im Weichagar. Zbl. Bakt. II. Abt. 134, 423-428.

Bernaerts, M.J. and De Ley, J., 1967: Mechanism of the 3-Ketolactose test for Agrobacterium. Arch. Microbiol. 56, 81-90.

Black, L.M., 1972: Plant Tumors of viral Origin. Progr. Expt. Tumor-Res. 15, 110-137.

Bomhof, G.H., 1974: Studies on Crown-Gall: A Plant Tumor investigation on Protein Compounds as a Marker for Transformed Cells. Dissertation, Leiden.

Bomhof, G.H., Klapwijk, P.M., Kester, H.C., Schilperoort, R.A., Hernalsteens, J.P. and Schell, J., 1976: Octopine and Nopaline: Synthesis and breakdown Genetically controlled by a Plasmid of *A. tumefaciens*. Mol. Gen. Genetics, 145, 177-181.

Bopp, M., 1965: Die Hemmung von *A. tumefaciens* durch D-Aminosäuren. Z. Naturforschg. 20 b, 899-905.

Bor-Chian, Lin., Okubara, P.A., Dutra, J.C. and Kado, C., 1976: Presence of a 160 Megadalton Plasmid in *A. radiobacter* and Relationship of Plasmis of Virulent and avirulent *A. tumefaciens*. Proc. Amer. Phytopath. Soc. 3, Abstr. 82.

-- --, and Kado, C., 1977: Studies on *A. tumefaciens*; VII. Avirulence induced by temperatur and Ethidium

bromid. Can. J. Microbiol. 23, 1554-1561.

Braun, A.C., 1958: Physiological Basis for Autonomous Growth of the Crown-Gall Tumor Cell. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 44, 344-349.

-- --, 1969: Abnormal Growth in Plants. In Stewart, F.C.(ed.): Plant Physiol. Vol. V B, 379-420. Acad. Press, New York.

Breed, S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R., 1957: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Williams Co. Baltimore.

Cetin, E.T., 1968: Pratik Mikrobioloji. Mentesh Matbaasi-Istanbul/Türkei.

Conn, H.J., 1942: Validity of the genus Alcaligenes. Journ. Bact. 44, 353-360.

Currier, T.C. and Nester, E.W., 1976: Evidence for Diverse Types of Pathogenicity Determining Plasmids in Agrobacterium. J. Bacteriol. 261, 157-165.

Dons, J.J., 1975: Crown-Gall: A Plant Tumor. Dissertation. Leiden.

Engler, G., Holsters, M., Van Montagu, M., Schell, J., Hernalsteens, J.P. and Schilperoort, R.A., 1975: Agrocin 84 Sensitivity: A Plasmid Determined Property in A. tumefaciens. Mol. Gen. Genetics. 138, 345-349.

Genetello, C., Van Larebeke, N., Holsters, M., De  
Pikker, A., Van Montegu, M. and Schell, J., 1977:  
Ti-Plasmid of Agrobacterium as a Conjugative Plasmid.  
Nature 265, 561-563.

Goldman-Ménage, A., 1970: Recherches sur le métabo-  
lisme azoté des tissus de crown-gall cultivés in vito.  
Ann. Sci. Nat. Bot. 12 e Ser., 11, 233-309.

Gordon, M.P., Farrand, S.K., Sciaky, D., Montoya, A.,  
Chilton, M.D., Merlo, D. and Nester, E.W., 1976:

The Crown-Gall Problem: In Molecular Biology of  
Plants, Symp. Univ. Minnesota, St. Paul.

Hamilton, R.H. and Fall, M.I., 1971: The Loss of Tumor  
initiating Ability in *A. tumefaciens* by Incubation  
at high temperature. Experientia 27, 229-230.

Hildebrand, E.M., 1940: A Micrurgical Study of Crown  
Gall infection in Tomato. J. Agric. Res. 61, 45-69.

Hirota, Y., 1960: The Effect of Acridine Dyes on  
Mating Type Factors in *E. coli*. Proc. Natl. Acad.  
Sci. 46, 57-64.

Hooykaas, P.J.J., C. Roobol and R.A. Schilperoort,  
1979 a: Regulation of the Transfer of TI-Plasmids  
of *A. tumefaciens*. Journ. Gen. Microbiol. 110, 99-109.

-- --, R.A. Schilperoort and A. Rörsch., 1979 b:  
Agrobacterium Tumor inducing Plasmids: Potential  
Vectors for the Genetics Engineering of Plants.

Genetic Engineering, Vol. 1. Ed. by J.K. Setlow. Plenum

publ. New York. 151-179.

Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., 1977:

Medizinische Mikrobiologie, 4. Aufl. Springer-Verlag.  
Berlin-Heidelberg-New York.

Jensen, C.O., 1918: Undersøgelser vedrørende nogle  
svulstlignende dannelser hos planter. Kgl. Vet. Land-  
boh. Aarskr, Kopenhagen. 91-143.

Kado, C., 1975: Studien on *A. tumefaciens*. III. A con-  
cept on the Role of *A. tumefaciens* DNA in Plant tumo-  
rigenesis. Proc. 1st. Intersect. Congr. Intern. Assoc.  
Microbiol. Soc. Tokyo. 101-130.

Kemp, J.D., 1977: A new Amino Acid Derivate present  
in Crown-Gall Tumor Tissue. (im Druck).

Kerr, A., 1969: Transfer of Virulence Between Iso-  
lates of *Agrobacterium*. Nature 223, 209-211.

-- --, 1975: A genetic Model for Pathogenity in *Ag-*  
*robacterium* and for Tumor induction in plants. J.  
Theor. Biol. 51, 409-417.

-- --, Manigault, P. and Tempé, J., 1977: Transfer of  
virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*.  
Nature 265, 560-561.

-- --, 1980: Biological Control of Crown-Gall Through  
Production of Agrocin 84. Plant Disease, 64, No. 1, 25-30.  
Amer. Phytopath. Soc.

-- --, and Roberts, W. P., 1976: *Agrobacterium*: Corre-

lation between transfer of pathogenity, octopine and nopaline metabolism and bacteriocin 84 sensitivity.

Physiol. Plant Path. 9, 205-211.

--- --, and Htai, K., 1974: Biological Control of Crown-Gall Through Bacteriocin Production. Physiol. Plant Path. 4, 37-44.

Klapwijk, P.M., 1979: The Role of Octopine in Conjugation and plant Tumor-formation by *A. tumefaciens*. Studies on Tumor inducing Plasmids. Dissertation. Leiden.

Kostof, D., 1930: Tumor and other Malformations on certain *Nicotiana* Hybrids. Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II. 81, 244- 260.

Kupila, S. and Stern, H., 1961: DNA Content of Broad Bean(*Vicia faba*) Internodes in Connection with Tumor induction by *A. tumefaciens*. Plant Physiol. 36,216-219.

Kurdjian, A. et Le Goff, L., 1966: Sur la variation de la morphologie des populations d'*A. tumefaciens* au cours de leur prolifération, dans différents milieux. C.R. Acad. Sci.(Paris) 262 D, 224-226.

Kuzela, S. and Grezna, E., 1969: Experientia, 25,776.

La Rue, C.D., 1937: Cell Outgrowths from Wounded Surfaces of plants in Damp Atmospheres. Pap. Mich. Acad. Sci. 22, 123-139.

- Ledeboer, M., Krol, A.J.M., Dons, J.J.M., Spier, F., Schilperoort, R.A., Zaenen, I., van Larebeke, N. and Schell, J., 1976: On the Isolation of TI-Plasmid from *A. tumefaciens*. *Nucleic Acids Res.* 3, 449-463.
- Lippincott, B.B. and Lippincott, J.A., 1969: Bacterial Attachment to a specific Wound Site as an Essential Stage in Tumor initiation by *A. tumefaciens*. *J. Bact.* 97, 620-628.
- Lippincott, J.A. and Lippincott, B.B., 1970: Lysopine and Octopine promote Crown-Gall Tumor Growth in vivo. *Science* 170, 176-177.
- --,-- --, 1976: Nature and Specificity of the Bacterium-Host Attachment in *Agrobacterium* infection. *Symp. Cell Wall Biochemistry.* Tromso.
- --, Beiderbeck, R. and Lippincott, B.B., 1973: Utilization of Octopine and nopaline by *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.* 116, 378-383.
- --, and Heberlein, G.T., 1965: The quantitative determination of the infectivity of *A. tumefaciens*. *Amer. J. Bot.* 52, 856-863.
- --, Lippincott, B.B. and Chang, C.C., 1972: Promotion of Crown-Gall Tumor Growth by Lysopine, Octopine, nopaline and Carnosine. *Plant Physiol.* 49, 131-137.
- Menagé, A. et Morel, G., 1964: Sur la presence

d'octopine dans les tissus de crown-gall. C.R. Acad. Sci.(Paris) 259D, 4795-4796.

Monod, J., 1946: Sur une mutation spontanée affectant le pouvoir de synthèse de la méthionine chez une bactérie coliforme. Ann. Inst. Pasteur. 72, 879-890.

Morel, G., Goldman, A., Petit, A. and Tempé, J., 1969: Evidence for the Transmission of a Permanent Information from *A. tumefaciens* to the plant Cell During tumoral Transformation. XI. Intern. Bot. Congr. Seattle, 151.

Nester, E.W., Chilton, M.D., Drummond, M., Montoya, A., Sciaky, D. and Gordon, M.P., 1976: Search for Bacterial DNA in Crown-Gall Tumors. 10th. Ann. Miles Symp., Raven Press. New York.

Petit, A. et Tempé, J., 1976: Etude du métabolisme de l'homooctopine et de l'un de ses analogues par l'*Agrobacterium tumefaciens*. C. R. Acad. Sci.(Paris) 282 D, 69-71.

Petit, A., Del Haye, S., Tempé, J. et Morel, G., 1970: Recherches sur les guanidines de tissu de crown-gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les quelles induisent. *Physiol. Veget.* 8, 205-213.

Primose, S.B., 1976: Einführung in die Virologie. Weinheim: Verlag Chemie, Weinheim: Physik Verlag. (Taschentext: 40).

Rathsack, R. und Brucker, W., 1961: Der Pflanzenkrebs.  
Franckh'sche Verlagshandlung. Stuttgart.

Riker, A., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W.,  
und Sagen, E.H., 1930: Studies on infections hairy-  
root of nursery apple trees. Journ. Agric. Res. 41,  
507-540.

Roberts, W.P. and Kerr, A., 1974: Crown-Gall Induc-  
tion: Serological Reactions, Isozyme Patterns, and  
Sensitivity to Mitomycin C and Bacteriocin of Patho-  
genic and nonpathogenic Strains of *A. radiobacter*.  
Physiol. Plant Path. 4, 81-92.

--- --, Tate, M.E. and Kerr, A., 1977: Agrocin 84 is  
a 6-N-Phosphoramidate of an Adenin Nucleotide Ana-  
logue. Nature 265, 379-381.

Rubio-Huertos, M., Beltrá, R., and Santaolalla, M.,  
1972: Ultrastruktur of Stable L-Phase of *A. tumefaciens*  
Causing Tumor Formation in *Phaseolus vulgaris*. L. Mic-  
robiol. Espan. 25, 263-274.

Saccone, C., Gadeleta, M.N., and R. Gallerani, 1969:  
Eur. J. Biochemistry. 10, 61.

Schell, J., 1975: The Rolle of Plasmids in Crown-  
Gall Formation by *A. tumefaciens*. In Ledoux, L. (ed)  
Genetic Manipulations with Plant Materials, Plenum  
Publ. Co. New York.

Schell, J. Van Montagu, M., De Pikker, A., De Waele,

D., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Messens, E. Silva, B., V.D. Elsacker, S., van Larebeke, N. and Zaenen, I., 1976: Agrobacterium tumefaciens: What Segment of the Plasmid is Responsible for the Induction of Crown-Gall Tumors? In Bogorad, L. and Weil, J.H. (ed). Nucleic Acids and Protein Synthesis. in Plants. Plenum Press. New York.  
Schmidt, W.A. and Brucker, W., 1959: Zum Wachstum des Crown-Gall-Gewebes von Datura innoxia. Mill. in vitro. Flora 147, 242-262.

Simmons, J.S., 1926: A culture medium for differentiating organisms of typhoid colon Aerogenes group and for isolation of certain fungi. J. Inf. Dis. 39, 232-238.

Slonimski, P.P., Perrodin, G. and Croft, J.H., 1968: Ethidium bromide Induced Mutation of Yeast Mitochondria: Complete Transformation of Cell into Respiratory deficient non-chromosomal "Petites". Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, No.3, 232-238.

Spurr, H.W., Hildebrand, A.C. and Riker, A.J., 1965: The integral Association of chlorogenic Acid to Crown-Gall Tumor formation. Phytopath. 55, 1004-1008.

Stonier, T., 1960: A. tumefaciens Conn. II. Production of an antibiotic substance. J. Bact. 79, 889-898.

Van Lanen, J.M., Baldwin, I.L. and Riker, A. J., 1952:

Attenuation of Crown-Gall Bacteria by Cultivation in Media containing Glycine. *J. Bact.* 63, 715-721.

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., V.d. El-sacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J., 1974: Large Plasmid in *A. tumefaciens* essential for Crown-Gall Inducing Ability. *Nature* 252, 169-170.

Van Larebeke, N., Genetello, C., Schell, J., Schilperoort, R.A., Hermans, A.K., Hernalsteens, J.P. and Van Montegu, M., 1975: Acquisition of Tumor-inducing Ability by Non-oncogenic *Agrobacteria* as a Result of Plasmid transfer. *Nature* 255, 742-743.

Waring, M.J., 1966: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 16, 235.

Watanabe, T., and T. Fukasawa, 1961: Episome mediated Transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*: II. Elimination of resistance Faktors with Acridine Dyes. *J. Bact.* 81, 679-683.

Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D., and Nester, E.W., 1975: Studies on a Plasmid Required for virulens-of *A. tumefaciens*. *J. Bact.* 123, 255-264.

White, P.R., 1949: Prolonged Survival of Excised Animal Tissues in Nutrients of Known Constitution. *J. Cell Comp. Physiol.* 34, 221-236.

Winkler, U., Rüger, W., Wackernagel, W., 1972: *Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik.* Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York.

Wolfe, A.D., Thomas, M. Cook., and Fred E. Hahn, 1971:

- Antibacterial Nitroacridine, Nitroakridin 3582:  
Binding to Nucleic Acids in vitro and Effects an Selected Cell-Free Model Systems of Macromolecular Biosynthesis. Journ. Bact. 108, Nr. 3, 1026-1033.
- Yajko, D. and Hegeman, G.D., 1971: Tumor induction by *A. tumefaciens*: Specific Transfer of Bacterial DNA to Plant Tissue. J. Bacteriol. 108, 973-979.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M and Schell, J., 1974: Supercoiled Circular DNA in Crown-Gall inducing *Agrobacterium* Strains. J. Mol. Biol. 86, 109-127.