



Evolution und Nutzen der Wurzelknöllchensymbiose für den Pflanzenwirt

Rhizobien in der Pflanzenmikrobiota

KATHRIN WIPPEL | PAUL SCHULZE-LEFERT | RUBEN GARRIDO-OTER

In einem Kubikzentimeter Erde befinden sich über eine Milliarde Mikroorganismen. Ein Teil dieser Mikroben lebt in einer komplexen Lebensgemeinschaft mit Pflanzenwurzeln. Wurzeln verankern Pflanzen im Boden und stellen die mineralische Nährstoff- und Wasserversorgung oberirdischer Pflanzenorgane sicher. Doch warum hat sich ein Teil der Bodenmikroben auf ein Leben mit Wirtspflanzen spezialisiert? Wie beeinflusst die ► Pflanzenmikrobiota das Wachstum und die Gesundheit ihres Pflanzenwirtes? Die Forschung über die Pflanzenmikrobiota, d. h. die Gesamtheit der Mikroben, die eine Pflanze beherbergt, hat sich in wenigen Jahren zu einem eigenständigen Forschungsgebiet entwickelt. Anhand des Beispiels der Rhizobien-Bodenbakterien verdeutlichen wir deren Stellung in der pflanzlichen Mikrobiota und vertiefen das Verständnis der Evolution der seit langem bekannten Wurzelknöllchensymbiose.

Jede gesunde Pflanze, so wie auch jeder andere mehrzellige eukaryotische Organismus, ist in der Natur von einer Vielzahl an Mikroben umgeben, von denen nur ein Bruchteil den Pflanzenwirt dauerhaft besiedelt. Die Gesamtheit dieser Daueruntermieter wird als Pflanzenmikrobiota bezeichnet. Die Mitglieder der Mikrobiota werden gemeinhin als ► Kommensalen eingestuft, da die Beziehung zum Wirt unabhängig von einer Nahrungsbeziehung sein kann, und entweder der Mikroorganismus oder der Wirt Nutzen aus der Interaktion zieht, ohne den Partner zu schädigen. Die Erforschung von Zusammensetzung und physiologischen Funktionen der Mikrobiota sowie der Wechselwirkungen von Kommensalen sowohl untereinander als auch mit dem Pflanzenwirt, ist in den letzten Jahren zu einem eigenständigen Wissenschaftsfeld herangewachsen.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Es ist mittlerweile bekannt, welche bakteriellen Klassen und Ordnungen der Mikrobiota in einer Vielzahl untersuchter Pflanzenarten immer gemeinsam vorkommen und daher eine sogenannte Kernmikrobiota definieren. Außerdem ist eine ausgewogene Zusammensetzung der Mikrobiota in der Natur entscheidend für einen gesunden Wirt. Die Ordnung Rhizobiales gehört zur Kernmikrobiota der Pflanzen und beinhaltet eine Vielzahl von bodenbewohnenden Rhizobienarten, von denen einzelne Vertreter mit Hülsenfrüchtlern (Leguminosen) eine komplexe Wurzelknöllchensymbiose zur Bindung elementaren Stickstoffs eingehen. Diese ► Symbionten und die molekularen Grundlagen der biologischen Stickstofffixierung sind seit langem Gegenstand von Arbeiten über Pflanze-Mikroben-Interaktionen. In jüngerer Zeit wurden auf DNA-Sequenzen basierende Profile der Wurzelmikrobiota in natürlichen Habitaten erstellt, Stammsammlungen von Rhizobien-Wurzelkommensalen sowie ihrer eng verwandten Symbionten im Labor angelegt und vergleichende Genomanalysen dieser Bakterien durchgeführt. Diese Analysen erlaubten Rückschlüsse auf die stammesgeschichtliche Herkunft der Symbionten und führten zu einem besseren Verständnis der Funktionen ihrer verwandten Wurzelkommensalen innerhalb und außerhalb der Leguminosen.

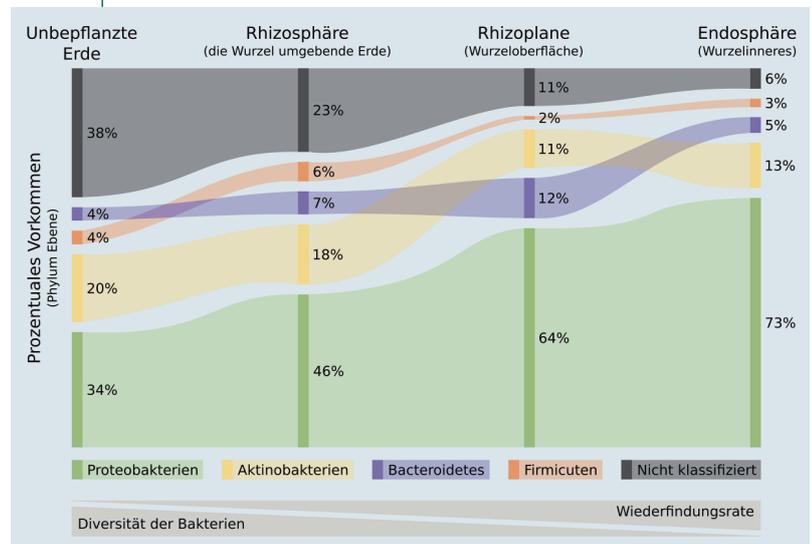
Wir geben zunächst einen Überblick über allgemeine Eigenschaften der pflanzlichen Mikrobiota, werden anschließend die Signalkaskaden zwischen Rhizobien und Wirt während der Wurzelknöllchensymbiose betrachten, um schließlich neue Erkenntnisse zur Evolution der Symbiose in dieser Bakteriengruppe darzulegen und die Rolle von Rhizobiales-Kommensalen in der Mikrobiota einzuordnen.

Die pflanzliche Mikrobiota – indirekter Schutz und Nährstoffversorgung des Wirts

Wenn Pflanzen krank oder kümmerlich aussehen, ist das oft auf den Befall mit ► pathogenen Mikroorganismen oder unzureichende Mineralstoffversorgung im Boden zurückzuführen. Mithilfe kultivierungsunabhängiger DNA-Sequenziermethoden können jedoch auch die Gesamtheit der

Mikroorganismen gesunder Pflanzen quantitativ erfasst und deren Mitglieder taxonomischen Gruppen zugeordnet werden. Die hochauflösende Unterscheidung mikrobieller Arten oder Gattungen wird durch DNA-Sequenzierung von universellen mikrobiellen Genen ermöglicht, die in allen Genomen innerhalb eines mikrobiellen Reiches zu finden sind, wie z. B. das Gen für die ribosomale 16S-Untereinheit in Bakterien. Der Vergleich solcher Studien zeigt, dass sich die bakterielle Mikrobiota von stammesgeschichtlich weit entfernten Pflanzenarten, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Böden angezogen wurden, stets aus Vertretern von sechs Klassen zusammensetzt: Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien, sowie Aktinobakterien, Bacteroidetes und, in bestimmten Bodensubstraten, auch Firmicuten (Abbildung 1) [1]. Diese Arbeiten zeigten, dass die Diversität bzw. die Artenvielfalt von Bakterien im unbepflanzten Boden außerordentlich hoch ist und dass diese Diversität zur ► Rhizosphäre (durch die Wurzel beeinflusster und mit ihr eng assoziierter Bodenraum) hin abnimmt, und in der ► Wurzelendosphäre (dem Innenraum der Wurzel) am geringsten ist. Dieses Gefälle lässt auf ein verhältnismäßig überschaubares Kollektiv von Bodenbakterien schließen, das auf das enge Zusammenleben mit der Pflanze spezialisiert ist. Bodenmikroorganismen ernähren sich in der Regel von organischen Kohlenstoffverbindungen wie organischen Säuren, Aminosäuren, Vitaminen und Zuckern, die von der Pflanze durch Photosynthese im Blatt produziert und durch den Vorgang der ► Rhizodeposition aus der Wurzel in den Boden ausgeschieden werden. Obwohl die Mikrobiota verschiedener Pflanzenarten auf der Ebene bakterieller Klassen ununterscheidbar ist, gibt es auf der Artenebene dieser Lebensgemeinschaft verblüffende Unterschiede, die wesentlich vom Bodentyp und daher von vorhandenen bakteriellen Mikroben mitbestimmt werden. Als ein Faktor der Assemblierung wirtsspezifischer Wurzelmikrobiota wird die für jede Pflanzenart typische Signatur der von Wurzeln in den Boden abgegebenen organischen Moleküle angenommen.

Die Zusammensetzung der Mikrobiota ist entscheidend für die Pflanze, da sie indirekt zu ihrem Schutz beiträgt. Je höher z. B. die mikrobielle Diversität in der Rhizosphäre und Wurzelendosphäre, desto resistenter ist die Pflanze gegenüber bodenbürtigen pathogenen Mikroorganismen. Dies wird durch eine aktive Hemmung der Pathogenvermehrung durch Wurzelkommensalen bewirkt. Laborexperimente mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass die Pflanzen am besten in keimfreiem Bodensubstrat mit definierten Lebensgemeinschaften aus im Labor kultivierten Bakterien-, Pilz- und Oomyzeten-Wurzelkommensalen gedeihen, und ein wenig schlechter, wenn nur Bakterien zugegeben werden. Nahezu alle Pflanzen starben jedoch, wenn das Bodensubstrat nur mit Pilz- oder Oomyzeten-gemeinschaften besiedelt wurde. Interessanterweise genügte die Zugabe von Bakterienkommensalen in den beiden letztgenannten Fällen, um die Pflanzen zu retten und ein normales Pflanzenwachstum sicherzustellen [2].

ABB. 1 | BAKTERIEN IM BODEN UND DER PFLANZENWURZEL


Im Boden und in Wurzelkompartimenten kommen unterschiedliche bakterielle Phyla und Abteilungen vor. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung aller detektierbaren Proteobakterien (grün), Aktinobakterien (gelb), Bacteroidetes (blau) und Firmicuten (rot), sowie aller nicht klassifizierten Bakterien (grau) innerhalb eines Kompartiments. Der Anteil an Proteobakterien innerhalb der Gesamtheit der Bakterien steigt von etwa einem Drittel in unbepflanzter Erde bis zu fast drei Viertel im Inneren der Wurzel. Im Gegensatz dazu nimmt die Menge an Aktinobakterien und unklassifizierten Bakterien stark ab. Die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft verringert sich demnach zunehmend von unbepflanzter Erde über die Rhizosphäre und die Wurzeloberfläche bis zum Wurzelinneren, da die entsprechenden bakteriellen Vertreter auf das Zusammenleben mit der Pflanze angepasst sind. Die Abbildung basiert auf Daten der mikrobiellen DNA-Sequenzierung von in natürlicher Erde angezogenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Bei der Etablierung mikrobieller Stammsammlungen ist die Wiederfindungsrate, also der Anteil an kultivierbaren Bakterien im Vergleich zu den bei der Sequenzierung identifizierten, in der Wurzel am höchsten, und in unbepflanzter Erde am geringsten.

IN KÜRZE

- Die Pflanzenmikrobiota ist ein Ökosystem, das die Gesamtheit der mikrobiellen Organismen, die mit der Pflanze assoziiert sind und deren Anwesenheit für Wachstum und Gesundheit des Wirtes in der Natur unabdingbar ist, umfasst.
- Mikrobiotamitglieder können isoliert, kultiviert und als wirtsspezifische Mikrobensammlungen aufbewahrt werden. Definierte Kombinationen dieser Mikroben werden dann gezielt in Experimenten mit keimfreien Pflanzen ko-kultiviert, um Funktionen und Mechanismen der Pflanzen-Mikrobiota-Interaktion zu entschlüsseln.
- Die bakterielle Ordnung der Rhizobiales gehört zur Kernmikrobiota und beinhaltet die gut untersuchten symbiontischen Wurzelknöllchenbakterien, die in nährstoffarmen Böden Stickstoff für ihre Wirtspflanzen, die Leguminosen, bereitstellen.
- Einige Rhizobiales-Stämme – aber auch andere Arten verwandter Ordnungen – unterdrücken die pflanzliche Immunabwehr, die normalerweise durch die Erkennung bakterieller Moleküle ausgelöst wird. Möglicherweise erlaubt dies erst die Besiedlung der Pflanze durch eine artenreiche Lebensgemeinschaft von Kommensalen.
- Genomgestützte Untersuchungen zeigen, dass die Fähigkeit zur Symbiose bereits in Vorfahren der knöllchenbildenden Pflanzen vorhanden war, aber im Laufe der Evolution mehrere Male unabhängig verloren ging.
- Umgekehrt wurde die Fähigkeit zur symbiontischen Stickstofffixierung durch Gentransfer in Wurzelkommensalen der Ordnung Rhizobiales mehrfach und unabhängig voneinander erworben.

Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus beruht offensichtlich auf einer evolutionär ursprünglichen Konkurrenz zwischen Bakterien und filamentösen Eukaryoten (Pilze und Oomyzeten) um pflanzliche Nährstoffe. In diesem Wettbewerb scheinen bakterielle Wurzelkommensalen durch Biosynthese antimikrobieller Moleküle das Wachstum wurzelassoziierter Pilze und Oomyzeten (von symbiontisch über neutral bis pathogen) unter Kontrolle zu halten. Andererseits spielt das angeborene pflanzliche Immunsystem eine wirksame Rolle bei der Etablierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Zur Bekämpfung von Pathogenen synthetisieren Pflanzen entsprechende Phytohormone für die Immunabwehr (vorwiegend Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen), welche Signalkaskaden auslösen, die wiederum die Biosynthese und Ausschüttung einer Vielzahl pflanzlicher antimikrobieller Peptide und Sekundärmetabolite zur Folge haben. Entwaffnet man Pflanzen durch Inaktivierung von Genen verschiedener Phytohormonbiosynthese- oder -signalwege, verändert sich auch deutlich die wurzelassoziierte Mikrobiotazusammensetzung der Mutanten im Vergleich zur Wildtypfpflanze [3]. Diese und weitere Arbeiten [4] zwingen uns, das traditionelle Konzept des angeborenen pflanzlichen Immunsystems, das ausschließlich auf Eliminierung pathogener Mikroorganismen ausgerichtet ist, in Frage zu stellen. Vielmehr hat das Immunsystem der Pflanze darüber hinaus eine grundlegende Aufgabe für die geordnete Unterbringung von Mikrobiotakommensalen, welche ihrerseits einen indirekten Schutzschild der Pflanze gegenüber Pathogenen darstellen.

Eine weitere wichtige Rolle der pflanzenassoziierten Kommensalen ist die Mobilisierung von mineralischen Nährstoffen aus dem Boden. Lebenswichtige Mineralstoffe wie Phosphor und Eisen treten in der Erde zwar prinzipiell in ausreichenden Mengen auf, liegen jedoch oft nicht in einer für Pflanzen aufnahmefähigen Form vor. Sowohl bodenbürtige Bakterien als auch Pilze können dabei helfen, organisches Phosphat und Eisenionen (Fe^{3+}) aus den vorhandenen organischen und anorganischen Verbindungen im Boden für die Aufnahme durch pflanzliche Transportproteine zu mobilisieren [1, 5, 4]. So leben ungefähr 80 Prozent aller Pflanzenarten in Symbiose mit arbuskulären ► Mykorrhizapilzen, welche das Wurzelgewebe besiedeln, und können das vom Pilz assimilierte Phosphat direkt an einer spezialisierten Interaktionsmembran aufnehmen. Als essenzieller Bestandteil biologischer Bausteine wie DNA und Aminosäuren ist Stickstoff ein wesentlicher Nährstoff, der das Wachstum von Pflanzen in der Natur begrenzt. In der Pflanzenmikrobiota existieren einige bakterielle Vertreter, die Rhizobien, die unzugänglichen elementaren Stickstoff aus der Atmosphäre umwandeln und für den Wirt bereitstellen können. Bemerkenswerterweise können Pflanzen in Abhängigkeit von der mineralischen Nährstoffverfügbarkeit den Modus des Zusammenlebens mit assoziierten Mikroorganismen anpassen [4, 5]. Beispielsweise vermittelt der wurzelbesiedelnde Bodenpilz *Colle-*

trichum tofieldiae in phosphatarmem Substrat durch Phosphattransport in den Pflanzenwirt einen Wachstumsvorteil für *Arabidopsis* und ist daher unter Nährstoffmangelbedingungen ein Nutzmikroorganismus der Pflanze. Phosphatmangel aktiviert in der Pflanze eine Phosphatstressantwort, die das Wachstum der Pflanze an den Nährstoffmangel anpasst. Regulatoren der Phosphatstressantwort sind außerdem direkt mit einem Arm des pflanzlichen Immunsystems verknüpft. Dadurch aktiviert *Arabidopsis* unter Phosphatmangel nur eine gedämpfte Immunantwort gegenüber *Colletotrichum tofieldiae*, während bei ausreichender Phosphatversorgung im Boden eine ungebremste Immunantwort der Pflanze Wachstum und Aktivität des pilzlichen Wurzeluntermieters einschränkt. Inaktiviert man die Immunantwort durch Mutation der zugehörigen Pflanzengene, wird *Colletotrichum tofieldiae* zum Pathogen und tötet *Arabidopsis* innerhalb weniger Tage.

Isolierung von Bodenbakterien – nützliche Stammsammlungen von Kommensalen

Die von der Kultivierung unabhängige Katalogisierung der pflanzlichen Mikrobiota war nur ein erster Schritt, um das komplexe Zusammenleben des Wirts mit dieser artenreichen Lebensgemeinschaft besser zu verstehen. Will man die zugrundeliegenden physiologischen Funktionen und molekularen Mechanismen dieser Interaktionen verstehen, bedarf es Methoden, mit denen Lebensgemeinschaften von Kommensalen im Labor nachgestellt werden können. Aus diesem Grund werden Bakterien, Pilze, und Oomyzeten aus verschiedenen gesunden Pflanzenorganen und Nischen isoliert, kultiviert und langfristig aufbewahrt. Nicht alle Kommensalen lassen sich einfach außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes kultivieren, da dies vermutlich Besonderheiten in der Zusammensetzung von synthetischen Nährstoffmedien im Labor erfordert. Trotzdem ist es bereits mehrfach für unterschiedliche Pflanzenarten und -habitate gelungen, Kommensalen-Stammsammlungen zu etablieren, die bezüglich ihrer phylogenetischen Diversität die Zusammensetzung der in der Natur vorkommenden Mikrobiota widerspiegeln (Abbildung 2) [6, 2, 3]. Das wiederum ermöglicht in der Forschung eine neuartige Form von Experimenten, bei der aus den Stammsammlungen gezielt Kombinationen von Kommensalen ausgewählt und zusammengestellt werden. Mit diesen sogenannten ► synthetischen Lebensgemeinschaften wird dann keimfreies Bodensubstrat beimpft, auf das anschließend keimfreie Pflanzensamen gesät werden, um Pflanze und Mikroben in einer geschlossenen Umweltschleife zu ko-kultivieren. So kann zum einen die Interaktion verschiedener Kommensalen untereinander untersucht werden, und zum anderen der Einfluss bestimmter Kombinationen dieser Mikroorganismen auf die Wirtspflanze erforscht werden. Eine Auswahl von sieben mit Maiswurzeln assoziierten Kommensalenstämmen vermittelte z. B. eine erhöhte Resistenz der Pflanze gegenüber dem pathogenen

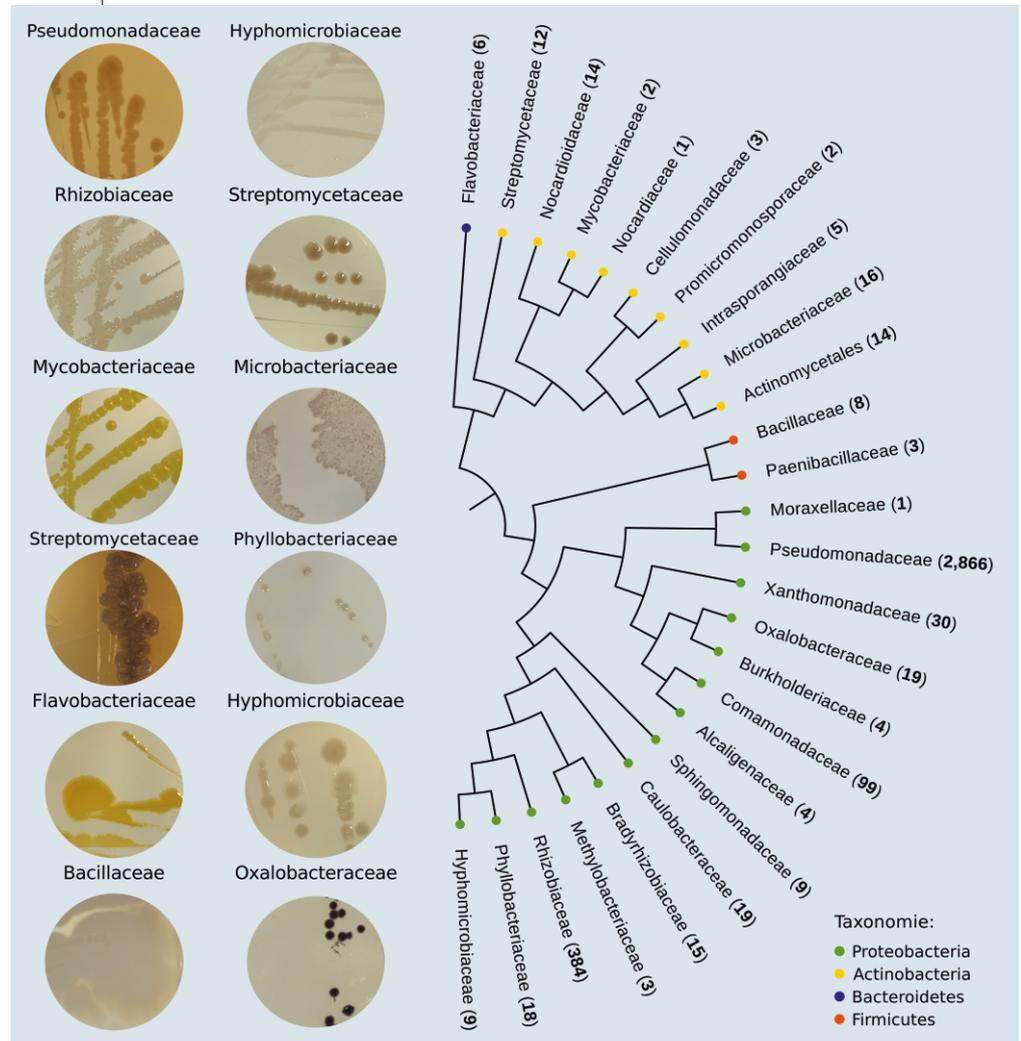
Pilz *Fusarium verticillioides* [7]. In einer anderen Arbeit wurden zunächst kleine Gruppen von bakteriellen Wurzelkommensalen, die sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Phosphatanreicherung im Pflanzenspross unterschieden, unterschiedlich miteinander kombiniert, und der Phosphatgehalt in *Arabidopsis*-Pflanzen nach Beimpfung untersucht. Der Phosphatgehalt entsprach größtenteils dem zu erwartenden Wert in Abhängigkeit von der Bakterienkombination, so dass durch Einsatz eines maschinellen Lernverfahrens vorausgesagt werden konnte, wie der Phosphatgehalt der Pflanzen bei einer noch ungeprüften Kombination ausfallen wird [8]. Auf lange Sicht werden solche auf synthetischen Kommensalengemeinschaften beruhenden Experimente dabei helfen, die komplexen Vorgänge in der natürlichen Pflanzenmikrobiota zu dechiffrieren, um schlussendlich minimal komplexe mikrobielle Gemeinschaften mit für die Landwirtschaft nützlichen Eigenschaften für Nutzpflanzen zu entwickeln.

Rhizobien sind die Hauptakteure der biologischen Stickstofffixierung

Für das Pflanzenwachstum notwendige mineralische Nährstoffe werden aus dem Boden über die Wurzeln aufgenommen. Wenn Böden arm an diesen Nährstoffen sind, oder diese Mineralien in unzugänglichen Verbindungen vorliegen, kann die Pflanze sie nur unzureichend oder gar nicht mobilisieren und aufnehmen. Aus diesem Grund wird in der Landwirtschaft meistens künstlicher Dünger auf die Feldflächen aufgetragen, um das Wachstum und den Ertrag der Nutzpflanzen zu steigern. Im Falle von Stickstoff erfolgt die Herstellung des künstlichen Stickstoffdüngers durch das Haber-Bosch Verfahren, bei dem energie- und kostenaufwändig Ammoniak (NH_3) aus elementarem Stickstoff erzeugt wird. So sind in den USA z. B. 30 Prozent der kommerziellen Energiekosten der Getreideproduktion auf die Produktion von NH_3 zurückzuführen. Die biologische Stickstofffixierung ist eine Alternative, die Ressourcen schont und kostengünstiger ist.

Bei der biologischen Stickstofffixierung setzen diazotrophe Bodenbakterien elementaren Stickstoff (N_2) aus

ABB. 2 | STAMMESGESCHICHTLICHE VERWANDTSCHAFT VON BAKTERIEN AUS WURZELN



Analysiert wurde eine Stammsammlung von Bakterien, welche aus Wurzeln verschiedener Pflanzen isoliert wurden. Der phylogenetische Stammbaum zeigt die bakteriellen Familien, die in der Stammsammlung vertreten sind, sowie die Anzahl an einzelnen Stämmen innerhalb dieser Familien (in Klammern). Die höhere Taxonomie ist farblich kodiert dargestellt. Die Wiederfindungsrate der Bakterien, also welcher Prozentsatz aller durch DNA-Sequenzierung identifizierten Stämmen tatsächlich auch isoliert und kultiviert werden konnte, betrug bis zu 65 Prozent. Die Fotoausschnitte auf der linken Seite der Abbildung zeigen auf Agar gewachsene Stämme und verdeutlichen, wie unterschiedlich Farbe und Morphologie der Bakterien einer Stammsammlung sein können.

der Atmosphäre zu Ammonium (NH_4^+) oder NH_3 um. Hierzu gehören die Rhizobien, die die Wurzelknöllchensymbiose mit Pflanzenarten der Leguminosen (z. B. Sojabohne, Kichererbse und Erdnuss) eingehen können. Jede dieser Pflanzenarten ist auf einen spezifischen Interaktionspartner unter den Rhizobien angewiesen, um eine erfolgreiche Symbiose zu etablieren. Ohne Interaktion mit dem Symbiont leiden die Pflanzen sichtbar unter Stickstoffmangel (Abbildung 3). Diese Spezifität beruht auf dem hochspezialisierten molekularen Signalaustausch zwischen Wirt und Bakterium, über den sich die beiden Organismen erkennen und gegenseitig beeinflussen [9]. Unter stickstoffarmen Bedingungen sezernieren Leguminosen bestimmte

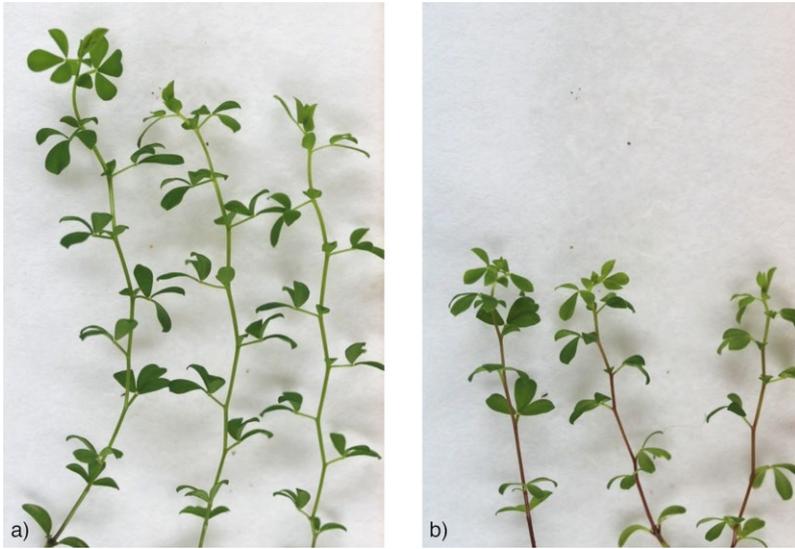


ABB. 3 *Lotus japonicus*-Sprosse von 35 Tage alten Pflanzen (Wurzeln wurden vor der Fotoaufnahme separat geernet), die mit (a) und ohne (b) bakteriellen Symbiont kultiviert wurden. Durch die fehlende Stickstofffixierung ohne Symbiont bleiben die Sprosse klein, die Blätter blass und der Stamm rot durch Anthozyanreicherung. Letztere wird bei Pflanzen im Allgemeinen als Teil der Stressantwort induziert.

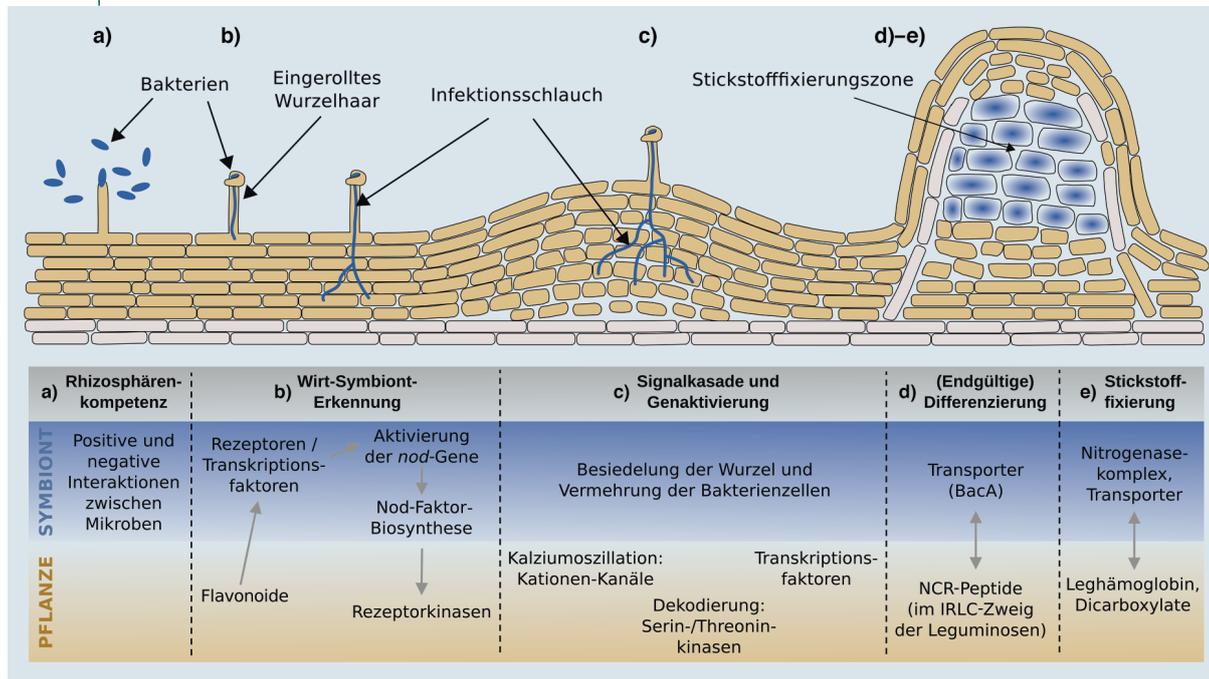
Sekundärmetabolite aus der Gruppe der Flavonoide aus ihren Wurzeln, um bakterielle Symbionten anzulocken. Flavonoide werden mithilfe eines Rezeptorproteins von Rhizobien erkannt und die bakteriellen Nodulationsgene (*nod*-Gene) aktiviert. Dies führt zur Biosynthese des Nodulationsfaktors (Nod-Faktor), einem ► Lipochitooligosaccharid, das von mehreren rezeptorähnlichen Kinasen in der Wurzel der Wirtspflanze erkannt wird. Die anschließende Signalkaskade aktiviert nodulationsspezifische Gene wie die zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren NIN und ERN1, die die Knöllchenentwicklung steuern (Abbildung 4). Eine kompatible Interaktion zwischen Rhizobium und Wirt kann nur erfolgen, wenn die molekularen Signale und Rezeptoren auf beiden Seiten zusammenpassen. Wenn man die Gene der entsprechenden Rezeptorproteine NFR1 und NFR5 der Modellpflanze *Lotus japonicus* (Gewöhnlicher Hornklee) in *Medicago truncatula* (Schneckenklee) in transgenen Pflanzen exprimiert [10], kann man beispielsweise *M. truncatula* dazu bringen, eine Symbiose mit *Mesorhizobium loti*, einem Symbionten von *L. japonicus*, einzugehen.

Als Reaktion auf die Detektion eines kompatiblen Symbionts finden morphologische Veränderungen im Wurzelgewebe statt (Abbildung 4). Wurzelhaare rollen sich ein und ermöglichen dadurch eine enge Anlagerung der Rhizobien an die pflanzliche Zellwand. Durch Einstülpung der Plasmamembran bildet sich eine tubuläre Struktur, der Infektionsschlauch, in den die Bakterien eindringen, sich vermehren und in die kortikalen Wurzelzellschichten gelangen. Die Bakterien werden letztendlich in die Pflanzenzellen des entstehenden Wurzelknöllchens entlassen, bleiben jedoch in einer organellähnlichen Struktur, dem

► Symbiosom, vom pflanzlichen Zellplasma getrennt. Der weitere Verlauf der Wirts- und Symbiontenzellentwicklung ist im Wesentlichen abhängig von der Leguminosenart: Tropische Leguminosen, wie z. B. Sojabohne, Erdnuss und Lotus, etablieren determinierte (im Wachstum begrenzte) Wurzelknöllchen, wohingegen Leguminosen der gemäßigten Klimazonen, wie *Medicago* und Erbse, nicht determinierte (im Wachstum nicht begrenzte) Knöllchen bilden, welche ein Meristem und mehrere Knöllchenzonen besitzen. Die Bakterien vermehren sich in den Symbiosomen, und in manchen Leguminosen vergrößern sie sich deutlich (5–10-fach). Sobald die Bakterien differenziert sind und Stickstoff fixieren, spricht man von Bakteroiden. In nicht determinierten Knöllchen und manchen determinierten Knöllchen findet man endgültig ausdifferenzierte Bakteroiden, welche zwar metabolisch aktiv sind und Stickstoff fixieren, aber keine Zellteilungen mehr durchlaufen, und außerhalb des symbiontischen Knöllchengewebes nicht lebensfähig sind. Nicht endgültig ausdifferenzierte Bakterioide ähneln den freilebenden Bakterien, und können aus den Knöllchen isoliert und vermehrt werden [11].

Die pflanzlichen ► NCR-(*nodule-specific cysteine-rich*)-Peptide spielen eine essentielle Rolle bei der endgültigen Differenzierung. Interessanterweise kommen diese 30–50 Aminosäuren langen Peptide nur in einer bestimmten Untergruppe der Leguminosen (IRLC: *inverted repeat-lacking clade*) mit undeterminierten Knöllchen vor. Die mittlerweile über 800 identifizierten NCR-Peptide (in *Medicago*) werden ausschließlich in symbiontisch aktiven Zellen der Knöllchen gebildet, und ähneln strukturell den vormals erwähnten antimikrobiellen Peptiden. Obwohl diese Peptide für freilebende Bakterien toxisch sein können, sind sie für die endgültige Differenzierung der Bakterioide notwendig. Wichtige aktuelle Fragestellungen in diesem Forschungsbereich betreffen die große Anzahl an NCR-Peptiden, die benötigt werden, ihre offensichtlich nicht schädigende Wirkung auf die Bakterioide und die Proteine, mit denen sie interagieren können.

Die Stickstofffixierung geschieht mithilfe des bakteriellen Nitrogenase-Enzymkomplexes, für dessen Funktionalität sauerstoffarme Bedingungen essentiell sind. Dafür ist die Anwesenheit von Leghämoglobin, eines sauerstoffbindenden Proteins, welches von den Leguminosen als Reaktion auf die Infektion mit Rhizobien synthetisiert wird, wichtig. Zur aktiven Wurzelknöllchensymbiose kommt es – wie oben erwähnt – nur unter stickstoffarmen Bedingungen, und wenn keine anderen für das Pflanzenwachstum wichtigen mineralischen Nährstoffe limitierend sind. In tropischen Urwäldern, die seit mehreren hundert Jahren als ungestörtes Ökosystem gedeihen konnten, gab es zu Anfang eine hohe Aktivität an Stickstofffixierung unter den vorhandenen Leguminosen-Bäumen, um den Nährstoffbedarf für den zügig heranwachsenden Wald zu decken. Mit zunehmender Reifung des Ökosystems und steigender Artenvielfalt verringerten Leguminosen die Stickstoff-

ABB. 4 | SIGNALAUSTAUSCH WÄHREND DER WURZELKNÖLLCHENSYMBIOSE


Der obere Teil der Abbildung zeigt anhand der Skizze einer Leguminosenwurzel den Verlauf der Knöllchenentwicklung. Die Buchstaben verweisen auf den jeweils in diesem Stadium stattfindenden Signalaustausch zwischen Wirt und Symbiont, wie im unteren Teil der Abbildung beschrieben.

fixierung auf ein Minimum, um unnötigen Energieverbrauch zu vermeiden. Bemerkenswerterweise können diese Pflanzen die symbiotische Stickstofffixierung jedoch wieder ankurbeln, sobald das Ökosystem gestört wird, wie z. B. durch Überflutungen, umgestürzte Bäume oder Rodungen [12]. In jedem Fall werfen die vielen molekularen Schnittstellen, bei denen während der Wurzelknöllchensymbiose pflanzliche und bakterielle molekulare Komponenten Hand-in-Hand funktionieren müssen, die Frage auf, welche Komponenten dieser Pflanzen-Mikroben-Interaktion wann in der Evolution von Pflanze und Bakterium entwickelt wurden.

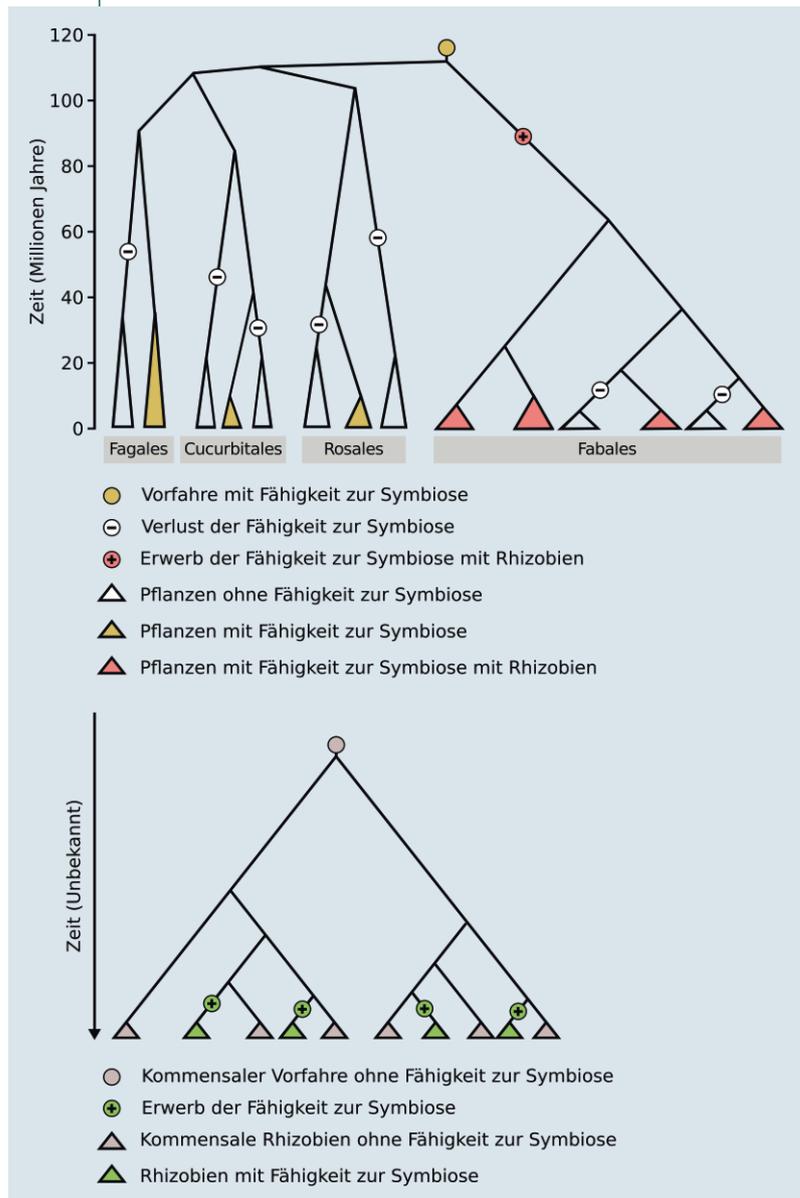
Evolution der Wurzelknöllchensymbiose

Um die Entstehungsgeschichte dieser spezialisierten Interaktionen zu verstehen, haben es sich in letzter Zeit mehrere Arbeitsgruppen zur Aufgabe gemacht, die evolutionäre Verwandtschaft innerhalb der Leguminosen und der Rhizobien zu untersuchen. Betrachtet man das Auftreten der zur Wurzelknöllchensymbiose fähigen Pflanzenarten in verschiedenen Gruppen der Blütenpflanzen, findet man zwar Vertreter in bestimmten Ordnungen von Blühpflanzen (Fabales, Fagales, Cucurbitales, Rosales), aber auch Arten, die nicht zur Symbiose fähig sind [13]. Um dies evolutionär zu erklären, sind zwei Szenarien denkbar: Ein gemeinsamer Vorfahre hat die Fähigkeit zur Symbiose ursprünglich gewonnen, und anschließend ging die Fähigkeit mehrere Male in bestimmten taxonomischen Abstammungslinien wieder verloren, oder die Fähigkeit zur Sym-

biose wurde mehrere Male unabhängig voneinander erworben. Bisher wurde unter Wissenschaftlern letztere Hypothese favorisiert. Dabei wurde unterstellt, dass das Genom des gemeinsamen Vorfahren bereits das allgemeine Potenzial (sogenannte ►Prädisposition) zur Symbiose besaß. Allerdings sprechen neue genombasierte Belege für eine andere Erklärung. Vor kurzem haben Griesmann und Kollegen die vollständigen Genomsequenzen von 37 verschiedenen nodulierenden (knöllchenbildenden) und nicht-nodulierenden Pflanzenarten miteinander verglichen. Diese Analyse lässt darauf schließen, dass der jüngste gemeinsame Vorfahre dieser Pflanzenarten einmal die Nodulationseigenschaften erlangt hat, und im Laufe der Evolution einige Pflanzenarten unabhängig voneinander diese Eigenschaften wieder verloren haben (Abbildung 5) [13]. In einer anderen Arbeit wurde *Parasponia*, die einzige nicht zu den Leguminosen gehörige stickstofffixierende Pflanzengattung, und die eng verwandte aber nicht symbiosefähige Gattung *Trema* untersucht. Durch den Vergleich der Genome und der Transkriptome dieser zwei Gattungen wurden in *Trema* Hinweise auf den Verlust von Genen gefunden, die in Leguminosen essentiell für die Knöllchenbildung sind. Demnach schließen die Autoren auch hier auf einen gemeinsamen Vorfahren, der die Fähigkeit zur Knöllchenbildung besaß, welche dann durch viele Verlustereignisse in anderen Arten verschwand (Abbildung 5) [14]. Diese neue Sichtweise lässt die unerwartete Interpretation zu, dass die Fähigkeit zur Symbiose anders als bisher angenommen nicht immer einen evolutionären

Vorteil darstellt. Dies ist durchaus von Bedeutung für die aktuellen Bemühungen mehrerer internationaler Forschungsteams, die daran arbeiten, die Fähigkeit zur Stickstofffixierung in Getreide, das taxonomisch zu den Gräsern gehört, durch stabilen Gentransfer mit Symbiosegenen aus Legu-

ABB. 5 VERLUST UND ERWERB DER FÄHIGKEIT ZUR SYMBIOSE IN PFLANZEN UND RHIZOBIEN



Der obere Teil der Abbildung veranschaulicht ein Szenario, in welchem der jüngste gemeinsame Vorfahre der stickstofffixierenden Pflanzenordnungen bereits die Veranlagung zur Symbiose besessen hatte, und wo diese Fähigkeit im Laufe der Evolution in manchen Abstammungslinien wieder verloren ging (Zeitangabe basiert auf fossilen Funden). Diese Hypothese wird durch aktuelle Daten unterstützt [14]. Der Vorfahre der Rhizobien hingegen war kein stickstoffbindendes Bakterium, sondern ein kommensaler Vertreter der Wurzelmikrobiota (unterer Teil der Abbildung; keine fossilen Daten vorhanden). Basierend auf aktuellen Forschungsergebnissen wurde die Fähigkeit zur Wurzelknöllchensymbiose darauffolgend mehrere Male unabhängig voneinander erworben [15].

minosomen zu rekonstruieren. Denn sollte ein solcher komplexer Gentransfer gelingen, wird dieses nützliche Merkmal vermutlich nur durch Selektion von Pflanzenzüchtern erhalten bleiben, während es unter natürlichen Selektionsbedingungen in der Natur verloren gehen würde.

Rhizobien gehören auch zu der Kerngruppe der Kommensalen, die man in der wurzelassoziierten Mikrobiota aller bisher untersuchten Pflanzenarten findet (Abbildung 1). Innerhalb dieser bakteriellen Ordnung der Rhizobiales unterscheiden sich die Familien, Gattungen und Arten stark in der Art und Weise ihres Zusammenlebens mit der Wirtspflanze. Die Evolution der Symbiose innerhalb der Rhizobiales wurde kürzlich mithilfe einer umfangreichen Stammsammlung untersucht [15]. Die annotierten Genome von mehr als 1300 Vertretern der Rhizobiales aus unterschiedlichen ökologischen Nischen (vorwiegend Pflanzenwurzeln, aber auch Insekten, Nematoden und unbepflanztem Boden) wurden miteinander verglichen und die Evolutionsgeschichte der für die Stickstofffixierung notwendigen Gene rekonstruiert. Dies zeigte, dass der jüngste gemeinsame Vorfahre der Rhizobien nicht in der Lage war, Stickstoff zu binden (Abbildung 5), vermutlich aber bereits Pflanzen besiedeln konnte. Wahrscheinlich wurde die Fähigkeit zur bakteriellen Stickstofffixierung in den einzelnen Familien der Ordnung Rhizobiales durch mehrere unabhängige natürliche Gentransfers erworben. Da es sehr viele nicht-symbiotische Arten unter den Rhizobiales-Vertretern gibt, die zur Kernmikrobiota der Pflanzen zählen, ist die metabolische Aktivität dieser Rhizobien im Zusammenleben mit ihrem Wirt von zukünftigem Interesse. Tatsächlich vermittelten die meisten im Labor geprüften Rhizobiales-Wurzelkommensalen unabhängig vom Nährstoffstatus der Pflanze ein verstärktes Wachstum der Primärwurzel von *Arabidopsis thaliana*. Einige dieser kommensalen Rhizobien waren auch in der Lage, die pflanzliche Immunantwort abzuschwächen. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass die kommensale Interaktion mit dem Wirt einen evolutionär ursprünglichen Zustand darstellt, und die Bakterien somit für die Entwicklung komplexerer Symbiosen mit rezenten Leguminosen prädisponiert waren (Abbildung 5).

Fazit

Die Interaktion zwischen Pflanzen mit symbiotischen oder pathogenen Mikroorganismen wurde bisher üblicherweise mit binären experimentellen Systemen im Labor erforscht, d. h. mit einer Pflanzenart und einem Mikroorganismus. Doch in der Natur finden diese Interaktionen immer in Anwesenheit einer artenreichen Mikrobiota statt. Innerhalb weniger Jahre haben es sowohl neu entwickelte molekulargenetische und bioinformatische Methoden als auch die Etablierung von pflanzenspezifischen Stammsammlungen von Kommensalen ermöglicht, Symbiose und Pathogenese im Kontext mikrobieller Lebensgemeinschaften in natürlichen Umwelten zu untersuchen und im Labor nachzustellen. Die Interpretation aktueller Daten

GLOSSAR

Rhizodeposition: Die Abgabe von organischen Stoffen und abgelösten Wurzelzellen aus der Wurzel in den umgebenden Boden.

Mykorrhizapilze: In einer engen Gemeinschaft mit Pflanzenwurzeln lebende symbiotische Pilze, die dem Wirt Phosphat zuführen und im Gegenzug Kohlenstoff erhalten.

Synthetische Lebensgemeinschaften: Kombinationen mikrobieller Organismen, die für Laborexperimente gezielt ausgewählt werden.

Lipochitooligosaccharide: Azylierte Chitin-Oligomere, die unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzen können; dienen bei Pflanzen-Mikroben-Interaktionen als Signalmoleküle (z. B. der Nodulationsfaktor von Wurzelknöllchenbakterien).

Symbiosom: Organellähnliche, von pflanzlicher Plasmamembran umgebene Struktur in reifen Wurzelknöllchen, in der sich Wurzelknöllchenbakterien zu stickstofffixierenden Bakteroiden entwickeln.

NCR-(nodule-specific cysteine-rich)-Peptide: Pflanzliche, 30-50 Aminosäuren lange Peptide, die nur in der IRLC (inverted repeat lacking clone)-Untergruppe der Leguminosen vorkommen, ausschließlich in Wurzelknöllchen produziert werden, und essentiell für eine erfolgreiche Wurzelknöllchensymbiose sind.

Prädisposition: Das genetisch kodierte Potenzial eines Vorfahren für die Ausprägung einer Eigenschaft in darauffolgenden Nachkommen.

legt nahe, dass die Wirtspflanze über ihr angeborenes Immunsystem in der Lage ist, sämtliche mikrobiellen Signale – von Pathogenen, Kommensalen und Symbionten – zu integrieren und Kommensalen kontrolliert zu beherbergen. Die Immunantwort des Wirtes wird mit der Nährstoffverfügbarkeit im Boden verrechnet und derart angepasst, dass Wachstum und Fortpflanzung der Pflanze auch unter Mangelbedingungen sichergestellt sind. Diese Erkenntnisse erfordern eine grundlegend veränderte Interpretation der Funktionen des pflanzlichen Immunsystems in natürlichen Umwelten und ermöglichen die Entwicklung von gezielt zusammengesetzten Probiotika für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft.

Zusammenfassung

Für das Wachstum und Überleben der Pflanze im Boden ist ihre Mikrobiota von maßgeblicher Bedeutung. Pflanzen-Mikrobiota-Interaktionen können unter Laborbedingungen durch definierte Gemeinschaften von Kommensalen nachgestellt und durch Ko-Kultivierung mit dem keimfreien Pflanzenwirt auf ihre Wirkung auf das Wachstum und die Gesundheit der Pflanzen geprüft werden. Die Ordnung der Rhizobiales gehört zum Kern der Pflanzenmikrobiota und beinhaltet stickstoffbindende Wurzelknöllchenbakterien, die in einer Symbiose mit Leguminosen leben. Nur kompatible Wirt-Symbionten-Paare können Symbiosen etablieren,

was durch hochspezialisierte und verknüpfte Signalwege zwischen den beiden Partnern gewährleistet wird. Vergleichende Genomanalysen von Symbionten und Rhizobiales-Wurzelkommensalen aus Nicht-Leguminosen zeigen, dass der jüngste gemeinsame Vorfahre zwar die Fähigkeit zur Wurzelbesiedelung mit breitem Wirtsspektrum besaß, symbiotische Interaktionen sich jedoch erst durch Gentransfer, der in der Evolution mehrfach unabhängig in mehreren Familien der Rhizobiales erfolgt ist, entwickelten.

Summary

Rhizobia in the plant microbiota

The plant microbiota is of critical importance for plant growth and survival in soil. To explore mechanisms underlying plant-microbiota interactions, defined commensal communities can be composed from microbiota culture collections and co-cultivated with germ-free plants to determine their impact on plant growth and health. The order Rhizobiales belongs to the core microbiota and includes nitrogen-fixing bacteria that are known to engage in symbiotic interactions with legumes. Compatible host-symbiont pairs are needed for a functional symbiosis, which involves the activation of highly specialized and interdependent signaling pathways between the two partners. Comparative genome analysis of more than 1,300 legume symbionts and rhizobial root commensals from non-leguminous plants revealed that the most recent common ancestor of rhizobia lacked the gene repertoire needed for symbiosis and was able to colonize roots of a wide variety of plants. During evolution, key symbiosis genes were acquired multiple independent times by commensals belonging to different families of the Rhizobiales order.

Schlagerworte:

Pflanze-Mikroben-Interaktion, Pflanzenmikrobiota, Wurzelknöllchensymbiose, Evolution

Literatur

- [1] D. Bulgarelli, K. Schlaeppi, S. Spaepen et al., Structure and functions of the bacterial microbiota of plants, *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64, 807–838.
- [2] P. Duran, T. Thiergart, R. Garrido-Oter et al., Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival, *Cell*, 2018, 175, 973–983 e914.
- [3] S.L. Lebeis, S. Herrera Paredes, D.S. Lundberg et al., Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa, *Science*, 2015, 349, 860–864.
- [4] K. Hiruma, N. Gerlach, S. Sacristan et al., Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent, *Cell*, 2016, 165, 464–474.
- [5] G. Castrillo, P.J. Teixeira, S.H. Paredes et al., Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity, *Nature*, 2017, 543, 513–518.
- [6] Y. Bai, D.B. Muller, G. Srinivas et al., Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota, *Nature*, 2015, 528, 364–369.
- [7] B. Niu, J.N. Paulson, X. Zheng et al., Simplified and representative bacterial community of maize roots, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114, E2450–E2459.

- [8] S. Herrera Paredes, T. Gao, T.F. Law et al., Design of synthetic bacterial communities for predictable plant phenotypes, *PLoS Biol.*, 2018, 16, e2003962.
- [9] G.E. Oldroyd, Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants, *Nat Rev Microbiol.*, 2013, 11, 252–263.
- [10] S. Radutoiu, L.H. Madsen, E.B. Madsen et al., LysM domains mediate lipochitin–oligosaccharide recognition and *Nfr* genes extend the symbiotic host range, *EMBO J.*, 2007, 26, 3923–3935.
- [11] E. Kondorosi, P. Mergaert and A. Kereszt A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors, *Annu Rev Microbiol.*, 2013, 67, 611–628.
- [12] S.A. Batterman, L.O. Hedin, M. van Breugel et al., Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession, *Nature*, 2013, 502, 224–227.
- [13] M. Griesmann, Y. Chang, X. Liu et al., Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis, *Science*, 2018, 361.
- [14] R. van Velzen, R. Holmer, F. Bu et al., Comparative genomics of the nonlegume *Parasponia* reveals insights into evolution of nitrogen-fixing rhizobium symbioses, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115, E4700–E4709.
- [15] R. Garrido-Oter, R.T. Nakano, N. Dombrowski et al., Modular traits of the Rhizobiales root microbiota and their evolutionary relationship with symbiotic rhizobia, *Cell Host Microbe*, 2018, 24, 155–167 e155.



Paul Schulze-Lefert, Jahrgang 1958, promovierte 1989 in Biochemie an der Universität zu Köln und ist seit 2000 Direktor der Abteilung für Pflanzen-Mikroben Wechselwirkungen am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln. 1991 gründete er eine Forschungsgruppe an der RWTH Aachen, die molekulare Mechanismen der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pilzpathogenen untersuchte. Von 1995 bis 2000 leitete er eine Forschungsgruppe im Sainsbury Laboratory des John Innes Centre, Norwich, UK, zur angeborenen Immunität von Pflanzen. Seine Forschungsarbeiten mit mehr als 150 Publikationen konzentrieren sich auf das Immunsystem der Pflanze und Funktionen der Pflanzenmikrobiota.



Ruben Garrido-Oter, Jahrgang 1984, studierte Computerwissenschaften und Mathematik in Madrid und Berlin, und promovierte in Bioinformatik an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Seit 2017 ist er Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln. Er untersucht komplexe mikrobielle Ökosysteme unter Anwendung bioinformatischer und experimenteller Ansätze.

Die Autoren:



Kathrin Wippel, Jahrgang 1982, studierte und promovierte an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen in Molekularer Pflanzenphysiologie. Von 2013–2016 war sie als DFG-Forschungsstipendiatin an der Stanford University, Kalifornien, USA, im Bereich mikrobielle Genregulation tätig. Seit 2017 ist sie wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich Pflanzenmikrobiota am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln.

Korrespondenz:

Paul Schulze-Lefert und Ruben Garrido-Oter
Department für Pflanzen-Mikroben Interaktionen
Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung
Carl-von-Linné-Weg 10
50829 Köln
Email: schlef@mpipz.mpg.de,
garrido@mpipz.mpg.de