

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

M. Sc. Christine Hübert

aus: Hannover

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Einsatz von *Erwinia tasmaniensis* und *Bacillus amyloliquefaciens*
als bakterielle Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Feuerbrands

Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann

Prof. Dr. Thomas Rausch

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. EINLEITUNG | 3 |
| 1.1 DER FEUERBRANDERREGER: <i>ERWINIA AMYLOVORA</i> (BURRILL) WINSLOW ET AL. | 4 |
| 1.1.1 Das <i>hrp</i> System und <i>Dsp</i> Proteine | 4 |
| 1.1.2 <i>Amylovoran</i> - und <i>Levansynthese</i> | 5 |
| 1.1.3 <i>Sorbitol</i> - und <i>Sucrosemetabolismus</i> | 5 |
| 1.2 DIE FEUERBRANDINFEKTION..... | 6 |
| 1.3 FEUERBRANDBEKÄMPFUNG | 8 |
| 1.3.1 <i>Bakterielle Antagonisten</i> | 9 |
| 1.3.1.1 <i>Erwinia tasmaniensis</i> | 10 |
| 1.3.1.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> und <i>Paenibacillus polymyxa</i> | 12 |
| 1.4 PROBLEMATIK BEI DER BEWERTUNG VON BIOKONTROLLORGANISMEN | 15 |
| 1.5 FREILANDVERSUCHE MIT <i>E. AMYLOVORA</i> | 16 |
| 1.6 ZIELE DIESER ARBEIT | 17 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 GERÄTELISTE | 19 |
| 2.2 CHEMIKALIEN | 19 |
| 2.3 STÄMME, PLASMIDE UND PRIMER..... | 20 |
| 2.4 FORMULIERUNG DER ANTAGONISTEN..... | 23 |
| 2.5 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN | 23 |
| 2.5.1 <i>Zellanzucht</i> | 23 |
| 2.5.1.1 <i>Medien</i> | 23 |
| 2.5.1.2 <i>Antibiotika</i> | 24 |
| 2.5.2 <i>Lagerungsversuche mit Trockenprodukten der Antagonisten</i> | 25 |
| 2.5.3 <i>Aufzeichnung von Wachstumskurven</i> | 25 |
| 2.5.4 <i>Bestimmung der Korrelation zwischen Lumineszenz und Zellwachstum des Reporterstammes Ea 1/79 pfdC1Z'-lux</i> | 26 |
| 2.5.5 <i>Qualitativer Nachweis zur Adhäsion an Oberflächen</i> | 26 |
| 2.5.6 <i>Quantitative Bestimmung der Adhäsion an Oberflächen</i> | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.5.7 Nachweis zur Stärkespaltung mit Kaliumjodid | 27 |
| 2.6 HEMMVERSUCHE | 27 |
| 2.6.1 Agar-Diffusionstest | 27 |
| 2.6.2 Ko-Kultivierung von <i>E. amylovora</i> und bakteriellen Antagonisten | 28 |
| 2.6.2.1 Ko-Kultivierung von <i>E. amylovora</i> und bakteriellen Antagonisten bei 16°C | 29 |
| 2.6.3 Hemmversuche mit Kulturüberständen der Antagonisten | 29 |
| 2.6.4 Überprüfung der Hemmwirkung trockenformulierter Toxine | 30 |
| 2.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 31 |
| 2.7.1 Herstellung CaCl_2 kompetenter Zellen | 31 |
| 2.7.2 Herstellung elektrokompeter Zellen | 31 |
| 2.7.3 Transformation von DNA | 32 |
| 2.7.4 Elektroporation | 32 |
| 2.7.5 Plasmidpräparation mittels Kit | 32 |
| 2.7.6 Plasmidpräparation über alkalische Lyse | 33 |
| 2.7.7 Ankonzentrierung von DNA | 34 |
| 2.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) | 34 |
| 2.7.9 Agarose-Gelelektrophorese | 35 |
| 2.7.10 PCR-Aufreinigung mittels Kit | 35 |
| 2.7.11 Restriktionsverdau | 35 |
| 2.7.12 Ligation | 36 |
| 2.7.13 Herstellung der Komplementationsplasmide für <i>Et 1/99 Sm ymoB:: Tn5_Km^R</i> ... | 36 |
| 2.8 PFLANZENVERSUCHE | 38 |
| 2.8.1 Apfelblütenassay | 38 |
| 2.8.1.1 Wirkung von Antagonisten gegen <i>E. amylovora</i> auf der Blüte | 38 |
| 2.8.1.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl auf der Blüte | 38 |
| 2.8.1.3 Bestimmung des Sporenanteils auf der Blüte | 39 |
| 2.8.2 Birnenscheibenassay | 39 |
| 2.8.2.1 96-Well Screening von Feuerbrandantagonisten auf Birnenscheiben | 39 |
| 2.8.3 <i>IN VITRO</i> PFLANZEN | 40 |
| 2.8.3.1 Adhäsionsversuche auf <i>in vitro</i> Pflanzen | 40 |
| 2.9 FREILANDVERSUCHE IN MANNHEIM / KIRSCHGARTSHAUSEN | 40 |
| 2.9.1 Feuerbrandbekämpfungsversuch | 40 |
| 2.9.2 Untersuchungen zur Ausbreitung und Etablierung der Antagonisten im Freiland | 41 |
| 2.9.2.1 PCR-Nachweis von <i>E. tasmaniensis</i> | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9.2.2 Nachweis von <i>Bacillus</i> über Bestimmung der LZZ auf Selektionsmedium..... | 41 |
| 3. ERGEBNISSE | 43 |
| 3.1 KULTIVIERUNGSEXPERIMENTE MIT <i>E. AMYLOVORA</i> | 43 |
| 3.1.1 Korrelation zwischen Wachstum und Lumineszenz von <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> | 43 |
| 3.1.2 Hemmung von <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> durch <i>E. tasmaniensis</i> DS08 | 44 |
| 3.1.3 Hemmung von <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> durch <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 | 45 |
| 3.1.4 Hemmwirkung diverser Bazillen auf <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> | 46 |
| 3.1.5 Wirkung der Kulturüberstände von <i>E. tasmaniensis</i> DS08 und <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 auf <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> | 47 |
| 3.1.6 Wirkung von Kulturüberständen in Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt | 49 |
| 3.1.7 Wirkung von <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 und thermotoleranten Bazillen | 51 |
| 3.2 FORMULIERUNG BAKTERIELLER ANTAGONISTEN | 53 |
| 3.2.1 Wachstum von Zellen aus Flüssigkultur und Trockenformulierung..... | 53 |
| 3.2.2 Lagerfähigkeit von formulierten Antagonisten..... | 55 |
| 3.3 EINSATZ FORMULierter TOXINE..... | 56 |
| 3.3.1 Hemmwirkung formulierter Toxine im Agar-Diffusionstest..... | 56 |
| 3.3.2 Wirkung der formulierten Toxine auf <i>E. amylovora</i> in Flüssigkultur | 57 |
| 3.4 BLÜTENVERSUCHE | 59 |
| 3.4.1 Wirkung von <i>E. tasmaniensis</i> DS08 und <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 auf <i>E. amylovora</i> auf der Apfelblüte..... | 59 |
| 3.4.2 Wirkung von Toxinen auf <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> im Blütenassay..... | 61 |
| 3.4.3 Entwicklung von <i>E. tasmaniensis</i> DS08 und <i>E. amylovora</i> 1/79 <i>pdfC1-Z'-lux</i> auf der Blüte | 62 |
| 3.4.4 Entwicklung von <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 auf der Apfelblüte..... | 63 |
| 3.5 ADDITIVE ZUR WACHSTUMSFÖRDERUNG VON <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> FZB42 AUF DER BLÜTE | 65 |
| 3.6 FREILANDVERSUCHE | 68 |
| 3.6.1. Witterungsverhältnisse und Befall..... | 68 |
| 3.6.2 Wirkung von <i>E. tasmaniensis</i> DS08 und <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 im Freiland | 74 |
| 2.6.2.1 Schwankungsbereich des Bekämpfungsversuchs..... | 79 |
| 3.6.3 Etablierung und Verbreitung der Antagonisten im Freilandversuch..... | 81 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.6.3.1 | PCR-Nachweis von <i>E. tasmaniensis</i> im Freiland..... | 81 |
| 3.6.3.2 | Detektion von <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 Rif im Feldversuch 2015..... | 84 |
| 3.7 | MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON FEUERBRANDANTAGONISTEN..... | 86 |
| 3.7.1 | Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 Sm <i>ymoB::Tn5_Km</i> | 86 |
| 3.7.2 | Komplementation der Mutante <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 Sm <i>ymoB::Tn5_Km</i> | 88 |
| 3.7.3 | Untersuchungen zur Adhäsion von <i>E. tasmaniensis</i> 1/99..... | 89 |
| 3.7.4 | Überprüfung von Anheftung und Hemmwirkung auf <i>in vitro</i> Pflanzen..... | 90 |
| 3.8 | ENTWICKLUNG EINES HOCHDURCHSATZ - SCREENING SYSTEMS FÜR FEUERBRANDANTAGONISTEN <i>IN PLANTA</i> | 91 |
| 4. | DISKUSSION | 95 |
| 4.1. | <i>E. TASMANIENSIS</i> DS08 UND <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> FZB42 ALS ANTAGONISTEN GEGEN DEN FEUERBRAND | 95 |
| 4.1.1 | Hemmwirkung und Wirkungsmechanismus..... | 95 |
| 4.2 | WIRKUNG VERSCHIEDENER GRAM-POSITIVER ORGANISMEN AUF <i>E. AMYLOVORA</i> | 96 |
| 4.3 | FORMULIERUNG DER ANTAGONISTEN ZUR PRAKTISCHEN ANWENDUNG | 97 |
| 4.3.1 | Einsatz von formulierten Toxinen..... | 98 |
| 4.4 | WIRKUNG DER ANTAGONISTEN AUF DER APFELBLÜTE | 99 |
| 4.4.1 | Vergleich von <i>E. tasmaniensis</i> DS08 und <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 | 99 |
| 4.4.2 | Wirkung der Antagonisten unter Freilandbedingungen..... | 101 |
| 4.4.2.1 | Antagonistische Aktivität von <i>Bacillus</i> in Abhängigkeit von der Temperatur.... | 105 |
| 4.5 | DETEKTION VON ANTAGONISTEN IM FREILAND UND BEZUG ZU ERZIELTEN WIRKUNGSGRADEN IM FELDVERSUCH..... | 107 |
| 4.6 | DER EINFLUSS EINER MUTATION IN <i>YMOB</i> AUF DIE EIGENSCHAFTEN DES ANTAGONISTEN <i>E. TASMANIENSIS</i> | 110 |
| 4.7 | <i>IN PLANTA</i> SCREENING VON FEUERBRANDANTAGONISTEN..... | 112 |
| 4.8 | FAZIT..... | 114 |
| 4.9 | AUSBLICK..... | 115 |
| 5. | LITERATUR..... | 116 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| Amp | Ampicillin |
| Ba | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| cfu | <i>colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten) |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxyribonucleotidphosphat |
| Ea | <i>Erwinia amylovora</i> |
| EPPO | European Plant Protection Organisation |
| Et | <i>Erwinia tasmaniensis</i> |
| GZZ | Gesamtzellzahl |
| kaps. EPS | kapsuläres Exopolysaccharid |
| Km | Kanamycin |
| LB | Luria Bertani Medium |
| MM | Minimalmedium |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei 600 nm |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| Pp | <i>Paenibacillus polymyxa</i> |
| Rif | Rifampicin |
| RT | Raumtemperatur |
| St. I | Standard I Medium |
| Sm | Streptomycin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Tween 20 | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monilaureat |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galaktosid |

Zusammenfassung

Erwinia tasmaniensis und *Bacillus amyloliquefaciens* sind Antagonisten, die in Ko-Kultur eine vergleichbare Hemmwirkung auf den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* aufweisen. Unter Zugabe von Kulturüberständen der Antagonisten bei Anzucht von *E. amylovora* bestätigten sich Unterschiede in den potentiellen Wirkmechanismen der beiden Antagonisten. Während *B. amyloliquefaciens* Toxine mit einem hemmenden Effekt auf *E. amylovora* produziert, beruht die Wirkung von *E. tasmaniensis* auf dem Konkurrenzprinzip um vorhandene Nährstoffe, eine Toxinbildung ist für diesen Antagonisten nicht nachgewiesen. Zwischen verschiedenen Isolaten der Art *B. amyloliquefaciens* konnten vergleichbare Hemmeffekte beobachtet werden. In Hinblick auf eine Anwendung der Antagonisten in der Praxis wurde im Labor und Freiland mit formulierten Produktmustern gearbeitet. Die Formulierung der Antagonisten hatte keinen negativen Einfluss auf deren Wachstum und war mit dem Wachstum von nicht-formulierten Zellen vergleichbar. Unterschiede zeigten sich bei der Lagerstabilität: Während die Sporen von *B. amyloliquefaciens* bis zu zwei Jahren stabil gelagert werden konnte, war beim formulierten *E. tasmaniensis* nach wenigen Wochen ein rascher Abfall der Lebendzellzahl bei RT zu beobachten. Die Lagerung bei 4°C ermöglichte eine stabile Aufbewahrung von *E. tasmaniensis* von bis zu neun Monaten. Auf der Blüte, dem primären Einsatzort des Antagonisten, zeigten *B. amyloliquefaciens* max. 50% und *E. tasmaniensis* max. 80% Wirkungsgrad von im Laborassay. Die Entwicklung der Antagonisten auf der Blüte war vergleichbar, es zeigte sich allerdings ein deutlicher Unterschied bezüglich der maximalen Zelldichte. Im Fall von *B. amyloliquefaciens* war diese 10 bis 100-fach geringer als die von *E. tasmaniensis*. Untersuchungen zum Sporenan teil auf der Blüte ergaben, dass 24 h bis 36 h nach der Applikation von *B. amyloliquefaciens* FZB42 die Zellen sporulieren. Im Freiland konnte *E. tasmaniensis* in drei Jahren, auch bei hohem Feuerbrandbefall, konstante Wirkungsgrade von ca. 60% erreichen. Die Wirkung von *B. amyloliquefaciens* war stark von der Zugabe von Additiven abhängig und lag bei ca. 50%. Die Bestimmung von Eigenschaften, die eine Rolle beim Antagonismus spielen, ist ein wichtiger Aspekt für die Selektion. Dazu zählt auch die Anpassung an den Lebensraum auf der Blüte. Der genetische Hintergrund einer Transposonmutante von *E. tasmaniensis* mit einem auffälligen Phänotyp bezüglich Adhäsion und Pigmentbildung wurde genauer untersucht und auf homologe Eigenschaften in *E. amylovora* überprüft. Für eine effektivere Vorselektion potentieller Feuerbrandantagonisten wurde mit der Entwicklung eines *in planta* Screenings im 96-Well Format begonnen.

Abstract

Erwinia tasmaniensis and *Bacillus amyloliquefaciens* are bacterial antagonists with similar inhibitory effects on the Fire Blight pathogen *Erwinia amylovora* in co-culture. Application of the antagonists' supernatants to growing *E. amylovora* cells confirmed differences in the potential modes of action of both antagonists. Whereas *B. amyloliquefaciens* produces toxins with inhibitory effects on *E. amylovora*, the antagonism of *E. tasmaniensis* is based on competition for nutrients and no toxin production could be detected. Similar efficiencies have been observed between isolates of the species *B. amyloliquefaciens*. With regard to the practical application of these antagonists, formulated product samples were used in laboratory and field experiments. There was no disadvantage of formulated cells concerning growth in comparison to growth of non-formulated cells. However, both antagonists differed in their storability: Whereas spore formulations of *B. amyloliquefaciens* could be stored for at least two years without disadvantages, formulated *E. tasmaniensis* cells showed a rapid decrease in living cell counts when kept at RT for a few weeks. Storage at 4°C allowed the maintenance of a stable number of living cells for at least nine months. On the flower, the primary point of use for antagonists in Fire Blight control, *B. amyloliquefaciens* and *E. tasmaniensis* reached maximal efficiencies from 50% to 80% *in vitro*. The development of cells on the flower was similar between both antagonists. However, *B. amyloliquefaciens* revealed a difference regarding maximal cell numbers on the flowers. Final densities of *B. amyloliquefaciens* were 10 to 100-fold lower than *E. tasmaniensis*. Examination of the amount of spores on the flower showed, that 24 h to 36 h post application of *B. amyloliquefaciens* cells began to sporulate. In field trials *E. tasmaniensis* was able to reach constant efficiencies of approx. 60% in three years, even at high infestation levels. The efficiency of *B. amyloliquefaciens* strongly depended on the application of additives and reached a maximum of approx. 50%. The determination of features which play a role in antagonism is an important aspect for the selection of candidates in biological control of Fire Blight. These include antagonist-plant interactions as well as adaptation to the living space on the flower. The genetic background of an *E. tasmaniensis* transposon mutant, which showed a conspicuous phenotype regarding adhesion and pigment formation, was examined. A similar function of the impaired gene was also investigated in *E. amylovora*. The development of an *in planta* screening system in a 96-well format was started in this work to contribute for a more effective pre-selection of potential Fire Blight antagonists.

1. Einleitung

Feuerbrand ist eine der gravierendsten bakteriellen Infektionen im Obstbau. 1871 wurde die Krankheit erstmals erwähnt. Der Phytopathologe Thomas J. Burrill beschrieb damals eine Erkrankung, die in Nordamerika Birnenbäume befiel (Burrill 1871). Heutzutage ist der Feuerbrand weit verbreitet und kann auch in Europa, in Nordafrika, im mittleren Osten und Neuseeland gefunden werden (siehe Abbildung 1). Zum Wirtspflanzenkreis zählen bis zu 200 Arten aus 40 Gattungen der Familie der Rosaceae. Dazu zählen zum einen Obstsorten wie Apfel (*Malus* spp.), Birne (*Pyrus* spp.) und Quitte (*Cydonia* sp.), aber auch eine Reihe Zierholzgewächse wie Zwergmispel (*Cotoneaster* sp.), Mehlbeere (*Sorbus* sp.) und Weißdorn (*Crataegus* sp.) (Van Der Zwet & Keil 1979). Feuerbrand ist eine zerstörerische Krankheit, die sich innerhalb kurzer Zeit ausbreiten kann. Die Folge ist nicht nur das Absterben einzelner Bäume; ein Befall kann im schlimmsten Fall zur Rodung ganzer Obstanlagen führen. Die damit einhergehenden Verluste für den Obstbauern sind enorm, sodass ein großes Interesse daran besteht diese Krankheit weitestgehend einzudämmen (Vanneste 2000). Antibiotika sind gegen den Feuerbranderreger sehr effektiv, aber u.a. in Deutschland nicht als Pflanzenschutzmittel zugelassen (www.bvl.bund.de/infopsm). Ein Mittel, das eine ähnlich effektive Wirkung wie die Antibiotika zeigt, ist bisher nicht auf dem Markt. Die Entwicklung von effektiven Alternativen, die zur Bekämpfung des Feuerbrandes eingesetzt werden können, ist daher von besonderer Bedeutung.

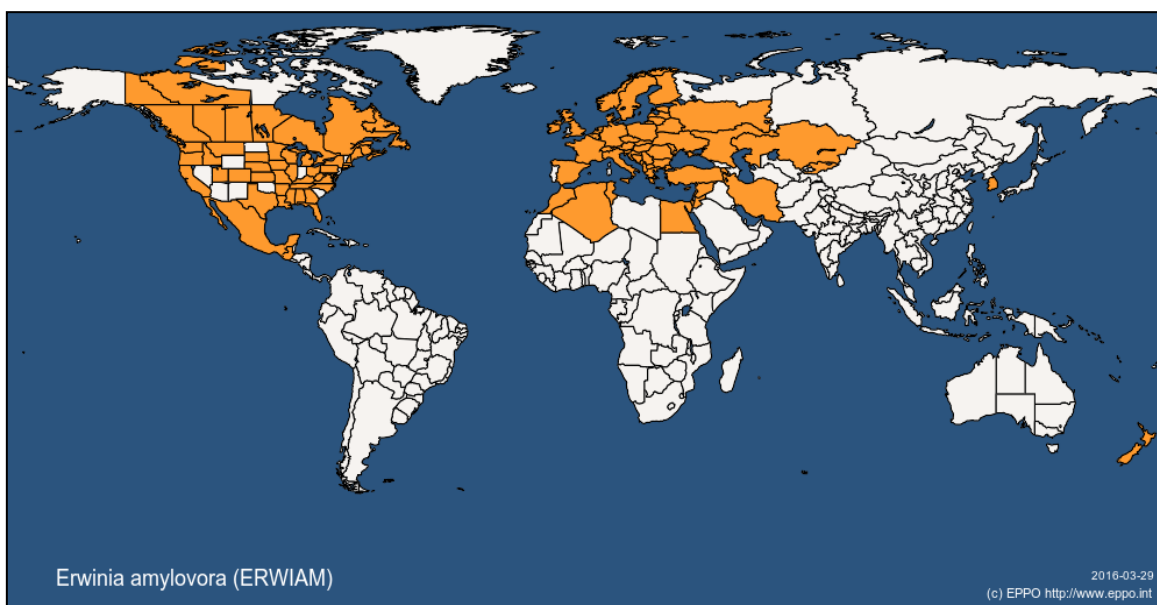


Abbildung 1: Übersicht über die Verbreitung des Feuerbrands. Die orange markierten Flächen zeigen die Länder, in denen Feuerbrandinfektionen beobachtet wurden. Betroffen sind Nord- und Mittelamerika, Europa, der mittlere Osten, Asien, Nordafrika und Neuseeland (nach: Eppo (2016a), Stand 29.03.2016).

1. Einleitung

1.1 Der Feuerbranderreger: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.

Burrill (1883) beschrieb den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* (Winslow et al. 1920) als erstes bakterielles Pflanzenpathogen. Es handelt sich dabei um ein stäbchenförmiges Gram-negatives Enterobakterium, in dessen Familie auch Human- und Tierpathogene zu finden sind (Breed et al. 1957). Die optimale Wachstumstemperatur von *E. amylovora* liegt bei 28°C. Bei Temperaturen in einem Bereich von 12 bis 21°C ist die Wachstumsrate deutlich verringert (Shrestha et al. 2005). Zwischen verschiedenen Isolaten gibt es deutliche Unterschiede. Isolate von infizierten *Rubus* Pflanzen sind beispielsweise nicht-pathogen auf *Malus* (Ries & Otterbacher 1977), können aber zum Teil Symptome auf unreifen Birnen verursachen (Powney et al. 2011). Darüber hinaus können verschiedene Stämme auch einen Unterschied in ihrer Aggressivität aufweisen (Cabrefiga & Montesinos 2005).

1.1.1 Das *hrp* System und Dsp Proteine

Beim Feuerbranderreger wurden zwei Hauptfaktoren beschrieben, die mit der Pathogenität dieses Organismus einhergehen. Dabei handelt es sich zum einem um ein Typ 3 Sekretionssystem (T3SS), das auf der Pathogenitätsinsel PAI-1 kodiert und als etablierter Pathogenitätsfaktor beschrieben ist (Oh et al. 2005). Die Gene für das T3SS liegen auf dem *hrp* (*hypersensitive reaction and pathogenicity*) Operon. Die Expression dieser Gene führt zur Sekretion von Effektorproteinen in das Cytosol der Pflanzenzelle, wodurch eine hypersensitive Reaktion (HR) auf Nicht-Wirtspflanzen ausgelöst wird, die zum Absterben von Zellen um die Infektionsstelle herum führt (Buttner & He 2009). Das Einschleusen dieser *disease specific proteins* (Dsp) in die Wirtspflanze trägt erheblich zur Symptombildung bei (He et al. 2004). *hrp*-negative Mutanten von *E. amylovora* sind apathogen (Gaudriault et al. 1997; Bogdanove et al. 1998).

Die Expression der *hrp* Gene wird stark durch Umweltsignale wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffgehalt kontrolliert (Wei et al. 1992). Zhao et al. (2005) zeigten, dass es bei der Infektion von unreifen Birnen u. a. zu einer Hochregulierung der Genexpression des T3SS kommt. Pester et al. (2012) zeigten, dass bereits 24 bis 48 h nach Inokulation der Blüte das Expressionslevel von *hrpL* (Regulator) und den *hrp*-regulierten Virulenzgenen *hrpA* (Pili), *hrpN* (Translokator) und *dspA/E* (Effektoren) ansteigt. Dies zeigte, dass dieses System in der frühen Phase der Infektion eine wichtige Rolle spielt.

1. Einleitung

1.1.2 Amylovoran- und Levansynthese

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor von *E. amylovora* ist die Synthese von Exopolysacchariden (EPS). Amylovoran ist der wichtigste Faktor in *E. amylovora*, der zur Biofilmbildung beiträgt und der ebenfalls als essentieller Pathogenitätsfaktor beschrieben ist (Koczan et al. 2009).

Bei Amylovoran handelt es sich um ein kapsuläres Polysaccharid, das aus wiederholenden Einheiten von Glucuronsäure und vier Galactosemolekülen besteht (Nimtz et al. 1996). Die Kapsel dient als Schutz vor der Pathogenerkennung der Wirtspflanze und damit verbundenen Abwehrreaktionen (Geider 2000). Die Menge an produziertem EPS spielt eine Rolle bei der Stärke der Virulenz (Ayers et al. 1979; Maes et al. 2001). Mutanten mit einem Defizit in der Amylovoransynthese sind apathogen und nicht mehr in der Lage, sich innerhalb der Pflanze auszubreiten (Bellemann & Geider 1992).

Ein weiteres Exopolysaccharid, das *E. amylovora* bildet, ist Levan, ein Homopolymer bestehend aus mehreren Fructose-Einheiten (Gross et al. 1992). Das Enzym Levansucrase ist in der Lage, die auch auf der Blüte vorhandene Sucrose zu spalten und - unter Freisetzung von Glucose - einzelne Fructoseeinheiten zu Levan zu polymerisieren (Geier & Geider 1993). Levan trägt ebenfalls zur Biofilmbildung bei, spielt bei der Pathogenität allerdings keine direkte Rolle, sondern trägt zur Virulenz bei (Koczan et al. 2009). Ein Defekt der Levansynthese führt zu einer verlangsamten Symptomausbildung (Geier & Geider 1993). Amylovoran und Levan bilden einen wichtigen Komplex bei der Biofilmbildung, der dazu beiträgt, dass das Pathogen erfolgreich das Xylem besiedeln und dort große Populationsdichten bilden kann (Koczan et al. 2011). Biofilme können zum einen Schutz vor abiotischen Faktoren wie z.B. Trockenheit bieten, zum anderen aber auch dazu beitragen die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu umgehen (Denny 1995). Die Expression der Levansucrase als auch die Regulation der Amylovoransynthese wird nach der Infektion von unreifen Birnenscheiben hochreguliert (Zhao 2005).

1.1.3 Sorbitol- und Sucrosemetabolismus

Um auf der Pflanze überleben zu können, muss eine adäquate Nährstoffversorgung gesichert sein. Pflanzen aus der Familie der *Rosaceae* nutzen hauptsächlich Sorbitol und Sucrose als Speicher- und Transport-Kohlenhydrate (Bogs & Geider 2000). Die höchste Konzentration an Sucrose in *Malus* ist im Nektar zu finden und damit in unmittelbarer Umgebung der primären Eintrittspforte des Feuerbranderreger (Braun & Hildebrand 2005).

Der Sucrosemetabolismus stellt somit einen wichtigen Aspekt bei der Kolonisierung der Pflanze dar (Thomson 1985).

1. Einleitung

E. amylovora Stämme mit einer Mutation im *scr* Regulon, sind nicht mehr in der Lage Sucrose zu verwerten und zeigen eine deutlich verminderte Symptomausbildung nach Infektion von Blättern von Apfelsämlingen.

Die an der Blattspitze applizierten Mutanten sind außerdem stark bei der Kolonisierung des Pflanzengewebes eingeschränkt (Bogs & Geider 2000). Mutanten von *E. amylovora* mit einem Defekt in der Sorbitolverwertung sind virulent auf unreifen Birnenscheiben, verursachen aber keine signifikanten Symptome nach der Infektion von Apfeltrieben (Aldrige et al. 1997). In den Blättern von *Malus* ist Sorbitol das primär vorkommende Kohlenhydrat, während bei *Rubus* weder in den Blättern noch im Nektar Sorbitol nachgewiesen werden konnte (Braun & Hildebrand 2005). Wachstumsversuche zeigten, dass *E. amylovora* Stämme, die von *Malus* isoliert wurden, bei der Kultivierung mit Sucrose oder Sorbitol als C-Quelle ähnliche Wachstumsraten aufwiesen. Isolate von *Rubus* hingegen wachsen in Gegenwart von Sorbitol deutlich schlechter (Braun & Hildebrand 2005).

1.2 Die Feuerbrandinfektion

Für den Feuerbranderreger können alle zugänglichen Pflanzenteile wie Blüten, Blätter und Triebe, insbesondere nach Verwundung, als Eintrittspforte in die Pflanze dienen. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Infektionszyklus von *E. amylovora* (modifiziert nach Wilcox (1994)).

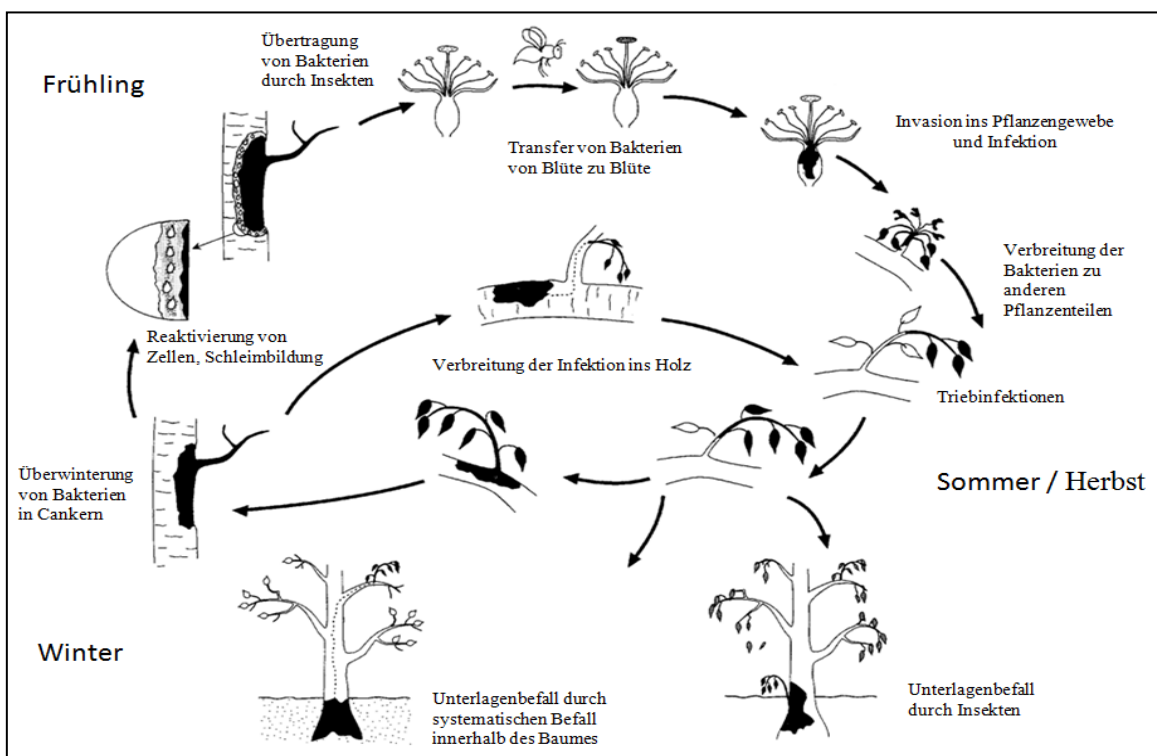


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Feuerbrand-Infektionszyklus (modifiziert nach Wilcox (1994)).

1. Einleitung

Die Primärinfektion findet in der Regel im Frühling auf frisch geöffneten Blüten statt (Schroth et al. 1974; Van Der Zwet & Beer 1991). Eine mögliche Inokulumquelle sind sogenannte Canker, befallene Stellen im Holz, in denen das Pathogen überwintern kann. Wenn im Frühjahr die Temperatur ansteigt, vermehren sich die Bakterien und bilden Schleim, der von Insekten, Regen und Wind verteilt wird (Miller 1929; Thomas & Ark 1934). Bienen, die wichtigsten Bestäuber von *Malus* und *Pyrus*, können bei Anflug einer kontaminierten Blüte den Erreger aufnehmen und von Blüte zu Blüte verbreiten (Hildebrand & Phillips 1936). Die Bedingungen für das Pathogenwachstum in der Natur variieren stark und sind abhängig von der Nektarzusammensetzung und -konzentration, den vorherrschenden Umwelteinflüssen und der Morphologie der Blüte (Johnson & Stockwell 1998). Regen und Tau können einen verdünnenden Effekt auf den Blütennektar haben. Die daraus resultierende Reduzierung des osmotischen Drucks erleichtert eine mikrobielle Kolonisierung der Blüte (Johnson & Stockwell 1998; Pusey 2000). Nach Übertragung des Erregers auf die Blüte wächst dieser zunächst in einer epiphytischen Phase auf der Narbe. Anschließend erfolgt die Migration des Erregers entlang des Griffels zum Blütenboden. Dieser Weg kann durch feuchte Bedingungen begünstigt werden. Schließlich erfolgt der Eintritt ins Gewebe durch die Nektarthoden (Thomson 1985; Hattingh et al. 1986). Etwa ein bis zwei Wochen nach der Infektion fangen die Blüten an abzusterben. Das Verbräunen der Blüten und die Bildung von Schleimtropfen an den Blütenstielen sind in der Regel die ersten Symptome, die beobachtet werden können (Abbildung 3A).

A



B



Abbildung 3: Symptome der Feuerbrandinfektion (Fotos: A. Wensing). A: Infizierte Blüte mit Schleimbildung am Stiel. B: Infizierter Trieb mit welken Blättern.

Die Bildung von Schleimtropfen bestehend aus EPS und Bakterien dient als Inokulumquelle für Sekundärinfektionen. Die Symptome können sich über Triebe und in die Unterlage ausbreiten (Momol et al. 1998).

1. Einleitung

Das Verstopfen der Leitgefäße durch Amylovoran führt zu einer Unterversorgung mit Wasser und hat das Welken von Blättern und Trieben von der Spitze her zur Folge (Abbildung 3B) (Sjulin & Beer 1977). Eine erfolgreiche Infektion hängt von einer Reihe Faktoren ab. Dazu zählen die vorherrschenden Umweltbedingungen (Pusey 2000), die Virulenz des Pathogens (Cabrefiga & Montesinos 2005) und die Sortenempfindlichkeit (Van Der Zwet & Keil 1979). Taylor et al. (2003) beschrieben, dass im Freiland erste Symptome sichtbar werden, wenn *E. amylovora* nach vier Tagen eine Zelldichte von 1×10^6 cfu / Blüte erreicht. Suboptimale Bedingungen können allerdings teilweise durch eine entsprechend hohe Dichte an Inokulum kompensiert werden (Shwartz et al. 2003).

1.3 Feuerbrandbekämpfung

Um einer möglichen Feuerbrandinfektion entgegenzuwirken, ist der Behandlungszeitpunkt von entscheidender Bedeutung. Das primäre Ziel sollte dabei der Schutz der frisch geöffneten Blüten sein. Doch schwankende Witterungsbedingungen machen es schwer, den optimalen Zeitpunkt für eine Behandlung gegen den Feuerbrand zu bestimmen, wenn die Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln auf ein Minimum reduziert werden soll.

Die Pflanzenschutzdienste arbeiten mit Prognose-Modellen, die zur Blütezeit Temperatur und Nässeereignisse bewerten, um eine möglichst genaue Voraussage über das Risiko einer Feuerbrandinfektion zu treffen. Eine Anpassung der Modelle an bestimmte Standortbedingungen spielt dabei eine wichtige Rolle (Billing 1980, 2007). Nach dem Maryblyt™ Modell spielen vier Hauptkriterien eine Rolle beim Auftreten eines Infektionsrisikos. Dazu zählen nach Moltmann (2004): 1. Offene Blüten. 2. Eine Summe von Stundengraden $\geq 18,3^\circ\text{C}$. 3. Niederschlagsmengen von $\geq 0,25$ mm durch Regen oder Tau oder $\geq 2,5$ mm Niederschlag am Vortag. 4. Eine Tagesdurchschnittstemperatur von $\geq 15,6^\circ\text{C}$.

In der Medizin sind Antibiotika das probateste Mittel gegen bakterielle Infektionen. Ihr Einsatz im Bereich des Pflanzenschutzes ist allerdings nur in den wenigsten Ländern erlaubt, da Bedenken wegen einer möglichen Resistenzbildung und des möglichen Auftretens von Rückständen der Antibiotika in Früchten und Honig bestehen (Stockwell & Duffy 2012). In den USA wird Streptomycin zur Feuerbrandbekämpfung eingesetzt. 1971 traten dort die ersten resistenten *E. amylovora* Stämme gegen dieses Antibiotikum auf (Miller & Schroth 1972). In der EU wird eine Antibiotika-freie Bekämpfung des Feuerbrands angestrebt. Als chemische Alternative wurde beispielsweise ein Kaliumalaun (LMA) getestet, das gute Ergebnisse im Freiland erzielt. Der Wirkungsgrad von LMA lag im Durchschnitt 10% bis 15% niedriger als der von Streptomycin (Fried 2013).

1. Einleitung

Auch der Einsatz biologischer Kontrollorganismen ist eine Möglichkeit zur Feuerbrandbekämpfung. Durch den Aufbau einer stabilen Antagonistenpopulation lassen sich Pathogene unterdrücken, sei es durch Konkurrenz um Lebensraum und/oder Nährstoffe oder durch die Bildung von für das Pathogen toxischen Substanzen (Loper & Buyer 1991).

Verschiedene Hefen sind als Feuerbrandantagonisten beschrieben, wie z.B. *Candida sake* und *Metschnikowia pulcherrima* (Pusey et al. 2009). Als kommerzielles Produkt ist Blossom ProtectTM verfügbar, das auf dem Organismus *Aureobasidium pullulans* basiert. Der Antagonist ist in der Lage die Blüte zu kolonisieren. Gleichzeitig sorgt die Applikation zu einem Absinken des pH-Wertes auf der Blütenoberfläche von neutral in einen sauren Bereich. Dadurch wird die Entwicklung des Feuerbrandpathogens blockiert. Der mittlere Wirkungsgrad von Blossom ProtectTM lag in Freilandversuchen bei 78% (Bio-Ferm 2012). Trotz des hohen Wirkungsgrades gegen *E. amylovora* ist der Einsatz dieses Antagonisten schwierig, da einige empfindliche Obstsorten bei der Behandlung Berostungsschäden aufweisen (Heidenreich et al. 1997). Außerdem muss der Einsatz mit Fungizidbehandlungen abgestimmt werden, die beispielsweise regelmäßig zur Bekämpfung des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) angewendet werden (Bio-Ferm 2012).

Auch Bakteriophagen zeigen eine Wirkung gegen *E. amylovora*. Die Effektivität fällt aber unterschiedlich aus, da verschiedene Phagenisolate eine hohe Wirtsspezifität aufweisen (Gill et al. 2003). Zudem ist die kurze Überlebensdauer von Bakteriophagen in der Phyllosphäre problematisch (Iriarte et al. 2007).

1.3.1 Bakterielle Antagonisten

Epiphytische Bakterien können ebenfalls als Antagonisten gegen Pathogene eingesetzt werden. Die vermuteten Wirkungsweisen der aktiven Mikroorganismen sind dabei verschieden. *Pseudomonas fluorescens* A506 (z.B. in Nordamerika als BlightBan[®] A506 vertrieben) hat die Fähigkeit gut auf der Oberfläche von Apfel- und Birnenblüten zu wachsen, was eine schnelle Etablierung des Antagonisten auf der Pflanze und damit die Unterdrückung des Wachstums von *E. amylovora* ermöglicht (Johnson et al. 1993). Um einen guten Wirkungsgrad zu erreichen, ist die präventive Applikation des Antagonisten nötig (Wilson & Lindow 1993).

Pantoea agglomerans C9-1 (in Nordamerika als BlightBan[®] C1-9 erhältlich) ist ebenfalls in der Lage hohe Zelldichten (bis zu 1×10^6 cfu) auf der Blüte zu erreichen (Stockwell et al. 1998). Darüber hinaus bildet dieser Stamm das Toxin Herbicolin.

1. Einleitung

Die Behandlung von unreifen Birnenscheiben mit dem Antagonisten vor der Inokulation mit *E. amylovora* führte zu einer verminderten Infektionsrate. Die Behandlung mit aufgereinigtem Toxin zeigte vergleichbare Hemmwirkungen wie der Einsatz des Antagonisten (Ishimaru et al. 1988).

In weiten Teilen der EU wird Serenade MAX[®] - basierend auf *Bacillus subtilis* QST 713 - als Antagonist gegen eine Vielzahl von Pflanzenkrankheiten eingesetzt (Aldwinckle et al. (2002).

Die beschriebenen Wirkmechanismen beruhen auf der Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe, der Synthese von Lipopeptiden mit antimikrobieller Wirkung sowie als Barriere gegen eine Oberflächenanheftung und dem Eindringen von Pathogenen ins Pflanzengewebe (Edgecomb & Manker 2006). Sammer et al. (2009) wiesen in *P. agglomerans* 48b die Bildung des Toxins 2-Amino-3-(Oxiran-2,3-Dicarboxarmido)-Propanoyl-Valin (APV) nach. Neben der Hemmung von *E. amylovora* wirkt APV unter Laborbedingungen auch auf andere Pflanzenpathogene wie diverse *Pseudomonas syringae* Pathovaren, *Agrobacterium tumefaciens* sowie auf das Humanpathogen *Candida albicans* und die Hefe *Yarrowia lipolytica*. Die Hemmung von *E. amylovora* mit einer APV-negativen Mutante auf unreifen Birnenscheiben und der Blüte ist mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Bildung stabiler Populationsdichten lag zwischen Mutante und Wildtyp vergleichbar bei 1×10^7 cfu / Blüte bis 1×10^8 cfu / Blüte bei der Ko-Inokulation mit *E. amylovora* (Sammer et al. 2012).

Das Wirkungsprinzip einiger Antagonisten beruht somit nicht unbedingt auf einem einzelnen Faktor. Vielmehr gibt es mehrere Eigenschaften, die eine Rolle bei der Hemmung eines Pathogen spielen können.

1.3.1.1 *Erwinia tasmaniensis*

Zu der Gattung *Erwinia* zählen neben *E. amylovora* noch weitere Pflanzenpathogene wie *E. pyrifoliae* (Rhim et al. 1999) und *E. piriflorinigrans* (Lopez et al. 2011). Es gibt aber auch nicht-pathogene Vertreter dieser Gattung wie *E. tasmaniensis* und *E. billingae*. *E. tasmaniensis* wurde erstmals von Apfel- und Birnenblüten in Australien isoliert (Geider et al. 2006a), wo der Feuerbrand nicht verbreitet ist (siehe auch Abbildung 1). Die Anpassung an das Überleben auf der Blüte, stellt einen Vorteil bei dem Einsatz von *E. tasmaniensis* als Antagonist dar (Jakovljevic et al. 2008). Dazu zählen die Eigenschaften der Adhäsion, Biofilmbildung, Beweglichkeit sowie die Fähigkeit ein breites Spektrum an Nährstoffen für den Metabolismus zu nutzen (Kube et al. 2008; Kube et al. 2010).

1. Einleitung

Bei einem gezielten Screening nach *E. tasmaniensis* in Pflanzenproben aus Afrika und Europa konnte diese Art ebenfalls nachgewiesen werden, sodass eine weltweite Verbreitung nicht auszuschließen ist (Jakovljevic et al. 2008; Kube et al. 2008). Der Einsatz dieses Antagonisten bei Infektionsversuchen auf unreifen Birnen und auf Apfelblüten zeigte, dass die Applikation hoher Zelldichten von *E. tasmaniensis* zu einer Wachstumsreduzierung von *E. amylovora* führt (Geider et al. 2006a; Jakovljevic et al. 2008; Kube et al. 2008; Kube et al. 2010). In Freilandversuchen zeigte *E. tasmaniensis* eine deutlich bessere Wirkung gegen den Feuerbrand als beispielsweise *E. billingae* (Fried 2008, 2009).

In Tabelle 1 ist ein Vergleich wichtiger Eigenschaften zwischen dem Pathogen *E. amylovora* und dem Antagonisten *E. tasmaniensis* dargestellt, die bei der Interaktion mit der Pflanze eine Rolle spielen. In *E. tasmaniensis* konnte kein kapsuläres EPS identifiziert werden, wodurch eine mögliche Invasion von Pflanzenzellen durch die Erkennung der pflanzeigenen Abwehrreaktionen erschwert wird (Kube et al. 2008). Die Synthese von Levan ermöglicht es *E. tasmaniensis* die hohen Sucrosekonzentrationen auf der Blüte zu nutzen, indem die entlassene Glucose als C-Quelle genutzt werden kann. Auch ein Schutz gegen die Abwehrmechanismen der Pflanze ist denkbar (Jakovljevic et al. 2008). Sowohl das Pathogen als auch der Antagonist produzieren AI-2 als Signalmoleküle zur Kommunikation zwischen Spezies (Mohammadi & Geider 2007). *E. tasmaniensis* besitzt ein zu *E. amylovora* homologes T3SS, allerdings fehlt die HAE Region, in der Gene für die Sekretion von T3SS Proteinen und *hrp*-assoziierten Virulenzgenen kodiert sind. Diese Gene sind für die Virulenz des Feuerbranderreger in Apfel essentiell (Oh et al. 2005; Kube et al. 2008). Bei Anzucht in *hrp* induzierendem Medium lässt sich allerdings auch mit *E. tasmaniensis* eine HR auf Tabak induzieren (Jakovljevic et al. 2008).

Tabelle 1: Vergleich einiger Eigenschaften von *E. amylovora* und *E. tasmaniensis* (modifiziert nach Geider et al. (2006b); Palacio-Bielsa et al. (2012)). kaps. EPS = Amylovoran, AHL = Acyl-Homoserin-Lacton Synthese, AI-2 = Autoinducer 2 Produktion, HR = Hypersensitive Reaktion.

| Bakterium | kaps. EPS | Levan | AHL | AI-2 | Virulent (Apfel/ Birne) | HR (Tabak) |
|------------------------|------------------|--------------|------------|-------------|------------------------------------|------------------------|
| <i>E. amylovora</i> | Ja | Ja | Nein | Ja | Ja | Ja |
| <i>E. tasmaniensis</i> | Nein | Ja | Nein | Ja | Nein | (Ja)* |

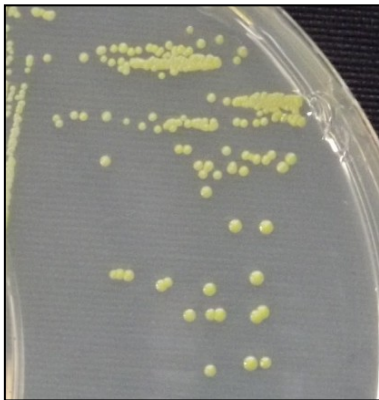
* Nach Anzucht in Induktionsmedium

1. Einleitung

Für das Wachstum auf der Pflanze muss der Antagonist gut angepasst sein. Die Anheftung auf der Pflanze ist ein wichtiger Aspekt bei der Besiedelung der Pflanzenoberfläche. Darüber hinaus sind Bakterien in der Phyllosphäre teilweise intensiver Sonneneinstrahlung ausgesetzt (Lindow & Brandl 2003). *P. agglomerans* bildet ein gelbes Pigment, wodurch das Bakterium eine höhere Strahlungstoleranz im Vergleich zu nicht-pigmentierten Arten wie z.B. *Escherichia coli* aufweist (Brenner et al. 2005; Le-Tien et al. 2007). Dies zeigten auch Klonierungsversuche, in denen die Gene für die Pigmentbildung in *E. coli* eingebracht wurden (Tuveson et al. 1988). Pflanzenpathogene wie *P. syringae* und *Xanthomonas campestris* bilden außerdem Adhesine, die die Anheftung auf der Pflanzenoberfläche begünstigen und einen wichtigen Aspekt bei der Kolonisierung der Pflanze spielen (Romantschuk et al. 1994).

Bei der Erstellung von Transposonmutanten von *E. tasmaniensis* 1/99 am JKI Dossenheim zeigte eine Mutante mit einer Insertion im Gen *ymoB* einen auffälligen Phänotyp (nicht publiziert). So zeigte die Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich gelbe Pigmentierung (Abbildung 4). Außerdem zeigt die Mutante eine stärkere Adhäsion als der Wildtyp und bei der Flüssigkultivierung bildet sich auf der Oberfläche des Mediums eine Krahnhaut. Beide Eigenschaften können bei der Entwicklung auf der Pflanze von Vorteil sein.

A



B



Abbildung 4: Vergleich der Koloniemorphologie zwischen der Mutante *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB::Tn5_Km^R* (A) und dem *E. tasmaniensis* 1/99 Sm Wildtyp (B). Die Bakterien wurden auf St. I Platten ausgestrichen und für 24 h bei 28°C inkubiert.

1.3.1.2 *Bacillus amyloliquefaciens* und *Paenibacillus polymyxa*

Bazillen sind geschätzte Kandidaten im Bereich der Biokontrolle. Ihre antagonistische Wirkung kann auf Komponenten wie toxischen Substanzen beruhen (Shoda 2000) oder mit der Stärkung der Wirtspflanze einhergehen, wodurch das Wachstum der Pflanze gefördert oder pflanzeneigene Verteidigungsmechanismen stimuliert werden (Kloepper et al. 2004).

1. Einleitung

Darüber hinaus bieten Bazillen einen Vorteil in Hinblick auf eine praktische Anwendung. Die Bildung von Sporen, die tolerant gegenüber Strahlung und Hitze sind, erleichtern die Lagerung und das Herstellen einer applizierbaren Formulierung als Pflanzenschutzprodukt (Raajmakers et al. 2002; Haas & Defago 2005).

Bacillus amyloliquefaciens FZB42 ist ein Gram-positives Bakterium, das aus pathogenbelasteten Bodenproben isoliert wurde (Krebs et al. 1998). *B. amyloliquefaciens* FZB42 ist über die ABiTEP GmbH als Biodüngemittel kommerziell erhältlich (<http://www.abitep.de>). Durch die starke Kolonisierung der Wurzeln und Bildung von Phytohormonen fördert *B. amyloliquefaciens* FZB42 das Pflanzenwachstum und ermöglicht der Pflanze durch eine gesteigerte Vitalität eine höhere Toleranz gegenüber biotischem und abiotischen Stress (Idris et al. 2007).

Das Genom von *B. amyloliquefaciens* hat eine Größe von 3,9 Mb. Etwa 8,5% der genetischen Kapazität wird für die Synthese von Sekundärmetaboliten genutzt (Chen et al. 2009a). Es konnten diverse Gencluster identifiziert werden, die eine Rolle in der Biokontrolle von pathogenen Organismen spielen (Koumoutsi et al. 2004). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass *B. amyloliquefaciens* FZB42 fünf Gencluster besitzt (*srf*, *bmv*, *fen*, *nrs*, *dhb*), die für nicht-ribosomal synthetisierte Toxine kodieren. Deren Biosynthese erfolgt an einem Multienzymkomplex, der nicht-ribosomalen Peptidsynthase (NRPS) (Koumoutsi et al. 2004). Die Peptide weisen eine hohe strukturelle Heterogenität auf. Für die Elongation der Peptidketten sind drei Domänen essentiell: Eine Adenylat-, eine Peptidyl-Carrier- (PC) und die Kondensationsdomäne (Chen et al. 2007).

Drei weitere Gencluster (*mln*, *bae*, *dif*) kodieren für die Polyketide Difficidin, Macrolatin und Bacillaen (Chen et al. 2006) und werden über eine Claisen Kondensation aus einer Acetyl-CoA Vorstufe synthetisiert. Eine Acyltransferase, eine Ketosynthase und eine Acyl-Carrier- (AC) Domäne werden für die Synthese benötigt, bei der je nach Anzahl der eingebauten Acetyl-CoAs eine Kettenverlängerung stattfindet (Walsh 2004). Mit Ausnahme von Bacilysin ist die Synthese der Toxine von einer Phospho-pantheinylyl-Transferase (Sfp) abhängig, die für die Aktivierung der PC- bzw. AC-Domänen zuständig ist. In einer *sfp* Knock-out Mutante wird keines der Sfp-abhängigen Toxine gebildet (Chen et al. 2007). Ein weiteres essentielles Protein ist das Membranprotein YczE, das höchstwahrscheinlich eine Rolle bei der Verankerung der Synthesen in der Membran spielt (Chen et al. 2007).

1. Einleitung

Einige der Cluster konnten im Vergleich zum Modellorganismus *B. subtilis* 168 spezifisch *B. amyloliquefaciens* FZB42 zugeordnet werden (siehe Tabelle 2). Aufgrund einer Frame-Shift Mutation im Gen *sfp* werden die nicht-ribosomalen Lipopeptide und Polyketide in *B. subtilis* 168 nicht gebildet (Mootz et al. 2001).

Chen et al. (2009b) bestimmten, welche Toxine eine direkte Wirkung auf das Feuerbrandpathogen *E. amylovora* haben. Dazu wurden verschiedene Mutanten konstruiert: Eine Δdfn Mutante, produzierte kein Difficidin mehr, dafür aber die Polyketide Bacillaen und Macrolatin. Die $\Delta bae \Delta mln$ Doppelmutante produzierte lediglich Difficidin. Auf der Blüte zeigen alle Mutanten eine Hemmwirkung gegen das Feuerbrandpathogen, der Wirkungsgrad der Δdfn Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp und der $\Delta bae \Delta mln$ Mutante minimal verringert (um ca. 5%). In weiterführenden Untersuchungen stellten Chen et al. (2009c) fest, dass auch eine Δsfp Mutante, die keine Polyketide mehr synthetisieren kann, im Agar-Diffusionstest einen vergleichbaren Hemmeffekt auf *E. amylovora* aufweist wie der Wildtyp, die Δdif und die $\Delta bac \Delta mln$ Mutante. Lediglich eine $\Delta sfp \Delta bac$ Doppelmutante zeigte keinen Hemmeffekt mehr, was darauf hindeutet, dass das von Sfp-unabhängig synthetisierte Dipeptid Bacilysin ebenfalls eine Rolle bei der Hemmung von *E. amylovora* spielt.

Tabelle 2: Übersicht über Gencluster zur Synthese von Toxinen in *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *B. subtilis* 168 im Vergleich (modifiziert nach Chen et al. 2007; Chen et al 2009a). NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthase, PKS = Polyketidsynthase, Sfp = 4-Phosphopantetheinyl-Transferase, YczE = Membranprotein, + = vorhanden, - = nicht vorhanden

| Bezeichnung (Cluster) | Ba FZB42 | Bs 168 | Synthese | Abhängig von [*] |
|---------------------------------|----------|--------|----------|---------------------------|
| Surfactin (<i>srf</i>) | + | + | NRPS | Sfp |
| Bacillomycin D (<i>bmy</i>) | + | - | NRPS/PKS | Sfp, YczE |
| Fengycin (<i>fen</i>) | + | + | NRPS | Sfp |
| Putatives Peptid (<i>nrs</i>) | + | - | NRPS | ? |
| Bacillibactin (<i>dhb</i>) | + | + | NRPS | Sfp |
| Bacilysin (<i>bac</i>) | + | + | NRPS | - |
| Macrolatin (<i>mln</i>) | + | - | PKS | Sfp, YczE |
| Bacillaen (<i>bae</i>) | + | + | PKS/PKS | Sfp, YczE |
| Difficidin (<i>dfn</i>) | + | - | PKS | Sfp, YczE |

^{*}Aufgrund einer Frame-Shift Mutation in *sfp* werden die Sfp-abhängigen Toxine in *B. subtilis* 168 nicht gebildet.

1. Einleitung

Ein ebenfalls Gram-positiver Organismus, der Toxine mit antimikrobieller Wirkung produziert ist *Paenibacillus polymyxa*. Dieses Bakterium konnte aus der Rhizosphäre diverser Getreidesorten und Futtergräsern isoliert werden (Lindberg & Granhall 1984). Neben der Eigenschaft das Pflanzenwachstums fördern zu können (Lebhuhn et al. 1997), zeigt *P. polymyxa* auch eine direkte Wirkung auf Pflanzenpathogene. Dazu zählen Pilze wie *Rhizoctonia solani*, *B. cinerea* und *Cladosporium fulvum* (Brewer & Larkin 2005; Ryu et al. 2006). Die Toxine können aber auch eine Wirkung auf bakterielle Pathogene haben. Niu et al. (2013) identifizierten Polymyxin P aus *P. polymyxa* M1 als aktives Toxin gegen den Feuerbranderreger *E. amylovora*.

In der Feuerbrandbekämpfung kann die Applikation von formulierten Toxinen eine Möglichkeit der Behandlung von Wirtspflanzen sein, indem eine direkte Wirkung auf das Pathogen ausgeübt wird.

1.4 Problematik bei der Bewertung von Biokontrollorganismen

Die im Vergleich zu Laboruntersuchungen häufig schwächere oder weniger zuverlässigere Wirkung im Freiland stellt ein großes Problem bei der praktischen Entwicklung von Antagonisten gegen Pflanzenpathogene dar. Nachgewiesene Wirkungsmechanismen *in vitro* sind auf der Pflanze möglicherweise nicht entscheidend. Temple et al. (2004) wiesen nach, dass die Produktion von Toxinen in *P. fluorescens* A506 von der Eisenverfügbarkeit in der Umgebung abhängig ist. Dieser Faktor ist auf der Blüte allerdings limitiert und die Antibiose von Pathogenen daher kein entscheidender Wirkmechanismus. Dieses Beispiel zeigt, wie essentiell der Test auf der Pflanze für eine abschließende Evaluation eines Kontrollorganismus ist.

Vogel et al. (2012) entwickelten ein *in planta* Screening System für Transposonmutanten von *Sphingomonas* sp. gegen das Pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mit *Arabidopsis thaliana*. Dabei wurden Samen von *A. thaliana* mit *Sphingomonas* behandelt und in 24-Well Platten für 14 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit einem lumineszierenden Pathogenstamm von *P. syringae* DC300. Sechs Tage nach der Infektion wurde die Lumineszenz in den einzelnen Wells gemessen und die Intensität mit einer Wildtyp-behandelten Kontrolle verglichen. Neben der Bestimmung des Pathogenwachstums über die Messung der Lumineszenz wurde außerdem die Symptomentwicklung der Pflanze beobachtet. Auf diese Weise ließen sich Mutanten detektieren, die einen Verlust ihrer antagonistischen Wirkung aufwiesen.

1. Einleitung

Je nach Wirtsspezifität ergeben sich allerdings Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines ähnlichen Testsystems. In der Feuerbrandforschung ermöglichen Versuche auf unreifen Birnenscheiben (Wrather et al. 1973) eine erste Einschätzung der Wirkung von Antagonisten direkt auf dem Pflanzengewebe. Um die Versuchsbedingungen noch näher an die Bedingungen in der Praxis anzupassen, bieten Blütenassays die Möglichkeit, die Entwicklung und Wirkung von Antagonisten auf *E. amylovora* zu untersuchen (Mercier & Lindow 1996; Pusey 1997). Die Wirtspflanzen von *E. amylovora* blühen nur einmal im Jahr, sodass sowohl die Birnenscheiben als auch die Blüten nur beschränkt verfügbar sind. Ein effektives Screening von Antagonisten mit hohem Durchsatz wäre daher wünschenswert, um die optimalsten Kandidaten im Freiland unter Praxisbedingungen zu testen.

1.5 Freilandversuche mit *E. amylovora*

Da es sich bei dem Feuerbrandpathogen in der EU nach Eppo (2016b) um einen Quarantäneorganismus handelt, sind die Möglichkeiten für die Arbeit unter Freilandbedingungen begrenzt. Das JKI Dossenheim unterhält in Mannheim / Kirschgartshausen eine Anlage, in der Feuerbrandversuche auf Apfelbäumen mit künstlicher Infektion durchgeführt werden können (Abbildung 5).



Abbildung 5: Luftaufnahme der Feuerbrand-Versuchsanlage in Mannheim / Kirschgartshausen (Foto: A. Wensing / W. Jelkmann). Die Pfeile zeigen die Größe der jeweiligen Quartiere an. Jedes Jahr wird ein Quartier für einen Bekämpfungsversuch an dreijährigen Bäumen durchgeführt und am Ende des Versuches das Quartier komplett gerodet und neu bepflanzt.

Um die Versuchsbedingungen möglichst konstant zu halten, stehen drei - abwechselnd für einen jährlichen Bekämpfungsversuch genutzte - Quartiere zur Verfügung. Dort sind Apfelbäume im Alter von ein, zwei bzw. drei Jahren gepflanzt.

1. Einleitung

Für den Versuch werden die dreijährigen Bäume genutzt. Nach Beendigung eines Versuches wird das jeweils verwendete Quartier gerodet und neu bepflanzt. Im Folgejahr wird dann ins nächste Quartier gewechselt, sodass konstant mit dreijährigen Bäumen gearbeitet werden kann.

Die Anlage in Kirschgartshausen bietet die Möglichkeit bei Bedarf Tröpfchenbewässerung oder Überkronenberegnung zuzuschalten. Über eine eigene Wetterstation werden seit Mai 2013 Daten zur Witterung direkt aus der Versuchsanlage erfasst. Die Anzahl der Bäume pro Quartier ermöglicht die Auswertung von ca. acht Bäumen in vier Wiederholungen pro Behandlungsvariante für maximal zehn bis zwölf Varianten. Pro Parzelle wird ein Baum künstlich mit dem Feuerbranderreger infiziert (1×10^8 cfu / ml) und das Pathogen von dort aus auf natürlichem Wege auf die benachbarten Bäume verbreitet. Zur besseren Ausbreitung des Erregers werden zusätzlich mehrere Bienenvölker in der Anlage aufgestellt. Der Versuchsaufbau richtet sich nach der von der EPPO vorgegebenen Richtlinie PP 1/166 (3) bei der eine Gesamtzahl von mehr als 200 Blütenbüscheln pro Parzelle und ein Mindestbefall von 5% erreicht werden müssen. Darüber wird sichergestellt, dass gegenüber dem Befall in der unbehandelten Kontrolle ein statistisch abgesichertes Ergebnis möglich ist.

1.6 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten bakterielle Antagonisten auf ihre Einsatzmöglichkeiten gegen den Feuerbranderreger *E. amylovora* untersucht werden. Dabei lag der Fokus auf dem Gram-negativen *E. tasmaniensis* DS08 und dem Gram-positiven *B. amyloliquefaciens* FZB42. Die vermuteten Wirkungsmechanismen der beiden Antagonisten beruhen entweder auf dem Konkurrenzprinzip und/oder der Bildung von Toxinen. Um die Hemmwirkungen von Antagonisten zu untersuchen, sollte ein Kultivierungsassay mit *E. amylovora* etabliert und *E. tasmaniensis* sowie verschiedene *Bacillus* Arten auf ihre Hemmwirkung getestet werden. Aspekte, die bei der Anwendung in der Praxis eine Rolle spielen können, wie die Produktion unterschiedlicher Toxine verschiedener *Bacillus* Arten und Wachstumstemperaturen außerhalb des Optimums sollten ebenfalls untersucht werden. In Hinblick auf einen Einsatz in der Praxis sollten Produktmuster von *E. tasmaniensis* DS08, *B. amyloliquefaciens* FZB42 und Toxinformulierungen getestet werden. Neben Untersuchungen zur Reaktivierung der Zellen aus Trocken- bzw. Flüssigformulierungen und Unterschieden in der Lagerstabilität, sollte auch die Wirkung und Entwicklung der Antagonisten auf der Apfelblüte genauer analysiert werden.

1. Einleitung

Im Rahmen eines Freilandversuches sollten Wirkungsgrad und auch die Ausbreitung der Antagonisten innerhalb der Versuchsanlage sowie die Etablierung auf der Blüte unter Freilandbedingungen überprüft werden.

Bei dem Überleben auf der Pflanze spielen Faktoren wie Attachment und Pigmentierung möglicherweise eine primäre Rolle. Molekularbiologische Untersuchungen mit der *ymoB*-Mutante aus *E. tasmaniensis* 1/99 sollten dazu beitragen, potentielle Regulationsmechanismen, die beim Überleben auf der Pflanze eine Rolle spielen können, zu untersuchen. Aufgrund der hohen Sequenzidentität von *ymoB* in *E. tasmaniensis* und *E. amylovora* sollte untersucht werden, ob eine homologe Funktion dieses Genes in Antagonist und Pathogen vorliegt.

Um die Bedingungen für Versuche im Freiland besser testen zu können und die limitierten Kapazitäten effektiver nutzen zu können, sollte außerdem die Vorselektion von potentiellen Antagonisten optimiert werden. Dazu sollte ein *in planta* Screening-System mit hohem Durchsatz entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräteliste

Folgende Geräte wurden standardmäßig verwendet:

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte.

| Gerät | Modell, Firma |
|-----------------------------------|---|
| Brutschrank | BE 400, Memmert |
| Elektronische Pipette, Multikanal | Research Pro, Eppendorf |
| Geldokumentation | Reprostar 3 UV-Tisch, Camag EOS1100d Kamera, Canon |
| Gelelektrophorese | Power Rac 3000, Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Gene Pulser | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Inkubationsschüttler | Certomat R, Sartorius Stedim Biotech |
| Platereader | Fluostar Omega, BMG Labtech |
| Multikanalpipette | Research Pro, Eppendorf |
| Mikrowelle | Pro II, Panasonic |
| Kleinschüttler | VXR basic Vibrax, IKA |
| Sterilbank | Bio-Flow Technik GmbH |
| Thermal Cycler | C1000 Touch, Bio-Rad |
| Vortexer | Relax 2000, Heidolph |
| Wasserbad | GFL 1003 Wasserbad, GFL |
| Zentrifugen | Centrifuge 5424, Eppendorf Centrifuge 5430R, Eppendorf |

2.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Herstellern bezogen:

| | |
|-----------------|---|
| AppliChem | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Bio-Sell | Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland |
| Fermentas | MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| Merck | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Nippon Genetics | Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland |
| Roth | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland |
| SIGMA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

2.3 Stämme, Plasmide und Primer

Folgende Stämme, Plasmide und Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 4: Auflistung der Bakterienstämme.

| Bezeichnung | Beschreibung | Referenz |
|---------------------------------------|--|--|
| ERWINIA SP. | | |
| <i>E. amylovora</i> 1/79 | WT, isoliert von <i>Cotoneaster</i> sp., Deutschland | Falkenstein et al. (1988) |
| <i>E. amylovora</i> 222_JKI | WT, isoliert von <i>Cotoneaster</i> sp., Tschechien | Fahrentrapp et al. (2013) |
| <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 | WT, isoliert von <i>Malus</i> , Australi- en | Geider (2006) |
| <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 Sm | spontanresistentes Et 1/99 Derivat, Sm ^R | Stammsammlung AG Feuerbrand, JKI |
| <i>E. tasmaniensis</i> DS08 | WT, isoliert von <i>Malus</i> , Deutschland | Gehring (2008), AG Feuerbrand, JKI |
| <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 Tn5_No.5 | Et 1/99 Sm <i>ymoB</i> ::Tn5_Km ^R | Stammsammlung AG Feuerbrand, JKI |
| BACILLUS SP. | | |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 | WT, Bodenisolat | Stammsammlung ABiTEP GmbH, Chen et al. (2007) |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 Rif | Spontanresistentes Ba FZB42 Derivat, Rif ^R | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> Abi 01 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> Abi 125 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> Gao B2 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> FV 11-6 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> FV 11-1 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 4: Auflistung der Bakterienstämme.

| Bezeichnung | Beschreibung | Referenz |
|---|--|---|
| <i>B. subtilis ssp spizizenii</i> Stamm 2 | WT, Bodenisolat | Stammsammlung ABiTEP GmbH, Reva et al. (2004) |
| <i>B. subtilis ssp subtilis</i> Stamm 8 | WT, Bodenisolat | Stammsammlung ABiTEP GmbH, Reva et al. (2004) |
| <i>B. pumilus</i> N6 | WT | Stammsammlung ABiTEP GmbH |
| <i>B. simplex</i> R41 | WT, kälterestistent | Stammsammlung ABiTEP GmbH, Bradáčová et al. (2016) |
| PAENIBACILLUS SP. | | |
| <i>P. polymyxa</i> M1 | WT, isoliert aus Wurzelgewebe von Weizen | Stammsammlung ABiTEP GmbH, Niu et al. (2013) |
| ESCHERICHIA SP. | | |
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>endA1, hsdR17, supE44, recA1,</i> <i>gyrA96, relA1, D(argF-lacZYA)</i> <i>U169, u80lacZDM15</i> | Sambrook et al. (1989) |

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Plasmide.

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|--------------|--|---------------------------|
| pfdC1-Z'-lux | P _{lac} , lacZ', luxCDABEG <i>Vibrio fischeri</i> , Km ^R | Bogs et al. (1998) |
| pKAN | Km ^R , Tn5 <i>nptII</i> Promotor fusioniert mit <i>gfp</i> | Joyner & Lindow (2000) |
| p3T | Amp ^R , M13 ori, lac Z, lac I | Mo Bi Tec |

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Plasmide.

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|---------|---|--------------|
| pYa-Ea | p3T; <i>ymoA</i> aus <i>E. amylovora</i> 1/79 | Diese Arbeit |
| pYba-Ea | p3T; <i>ymoBA</i> aus <i>E. amylovora</i> 1/79 | Diese Arbeit |
| pYa-Et | p3T; <i>ymoA</i> aus <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 | Diese Arbeit |
| pYb-Et | p3T; <i>ymoB</i> aus <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 | Diese Arbeit |
| pYba-Et | p3T; <i>ymoBA</i> aus <i>E. tasmaniensis</i> 1/99 | Diese Arbeit |

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit verwendet und als 100 pmol / μ l Stocklösung bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Primer. Et = *E. tasmaniensis* 1/99 (Accession No. NC_010694), Ea = *E. amylovora* ATCC 49946 (Accession No. NC_013971)

| Bezeichnung | Sequenz (5' => 3') | Bindestelle | Referenz |
|-------------|--------------------------|---|--------------------------|
| ETPSGL4124 | GATTGCTGTTCC GAGGTACG | Et Chromosom, downstream <i>lsc</i> | Wensing et al. (2012) |
| ETPSGL4760c | ACCGATGCCGAT ATAACCAC | Et Chromosom, downstream <i>glmS</i> | Wensing et al. (2012) |
| Et-ymo-f | AGTTTGTGGATA ACACCCG | Et Chromosom, upstream <i>ymoB</i> | Diese Arbeit |
| Et-ymo-fl | AGCCATAACTC TTTCTACGG | Et Chromosom, downstream <i>ymoB</i> | Diese Arbeit |
| Et-ymo-r | AGCTGGCAGGGC CCCCACC | Et Chromosom, downstream <i>ymoA</i> | Diese Arbeit |
| Et-ymo-r1 | ACCGTAGAAAGA GTTATGG | Et Chromosom, upstream <i>ymoA</i> | Diese Arbeit |
| Ea-ymo-f | TTGTTGATAACC ATCGCC | Ea Chromosom, upstream <i>hha</i> | Diese Arbeit |
| Ea-ymo-fl | TCCAGCCATTCA TTTAGC | Ea Chromosom, upstream <i>hha</i> | Diese Arbeit |

2. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 6: Auflistung verwendeter Primer. Et = *E. tasmaniensis* 1/99 (Accession No.: NC_010694), Ea = *E. amylovora* ATCC 49946 (Accession No.: NC_013971)

| Bezeichnung | Sequenz (5' => 3') | Bindestelle | Referenz |
|-------------|------------------------|--|-----------------------|
| Ea-ymo-r | AGCCGTAACAGA CGACG | Ea Chromosom, downstream <i>hha</i> | Diese Arbeit |
| Ea-ymo-r1 | TGAGGCGCATCA GGTAG | Ea Chromosom, <i>hha</i> | Diese Arbeit |
| M13F | TGTAAAACGACG GCCAGT | Plasmid p3T (Accession No. Z46733), <i>lacZ</i> | AG Feuerbrand, JKI |
| M13R | GGAAACAGCTAT GACCAT | Plasmid p3T (Accession No. Z46733), <i>lacI/Z</i> | AG Feuerbrand, JKI |

2.4 Formulierung der Antagonisten

In Hinblick auf eine praktikable Anwendung der Antagonisten in der Praxis wurden im Rahmen dieses Projektes von der ABiTEP GmbH Produktmuster der Antagonisten zur Verfügung gestellt. Diese beinhalteten gefriergetrocknete Zellen von *E. tasmaniensis* DS08 (4×10^{11} cfu / g) und getrocknete Sporen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 (5×10^{11} cfu / g). Die Formulierung von *E. tasmaniensis* DS08 enthielt darüber hinaus einen Zuckersatz. Von *B. amyloliquefaciens* FZB42 standen außerdem Flüssigformulierungen zur Verfügung. Zusätzlich wurden Toxin-haltige, getrocknete Kulturüberstände von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 bereitgestellt.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Zellanzucht

Die Zellanzucht erfolgte in der Regel in 10 ml Medium in Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler bei 140 rpm. Die Kultivierung von *Erwinia* und *Bacillus* erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 28°C. *E. coli* Zellen wurden bei 37°C kultiviert.

2.5.1.1 Medien

In Tabelle 7 sind die verwendeten Nährmedien aufgelistet.

Zur Herstellung von Festmedien wurden 15 g / l Agar zugesetzt. Die Sterilisation der Medien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, im Autoklaven bei 121°C.

Zum Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität wurde der Agar vor dem Gießen mit X-Gal (in DMSO) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 0,003% (w/v) X-Gal vorlag.

2. Material und Methoden

Tabelle 7: Übersicht über die Zusammensetzung der eingesetzten Medien.

| Medium | Zusammensetzung | Menge |
|--|--|-----------------|
| Luria-Bertani (LB) Art. Nr.: X968.1 | <u>Fertigprodukt (Roth)</u> | <u>25 g / l</u> |
| | Trypton | 10 g |
| | Hefeextrakt | 5 g |
| | NaCl | 10 g |
| Standard I (St. I) Art. Nr.: AE92.1 | <u>Fertigprodukt (Roth):</u> | <u>25 g / l</u> |
| | Pepton | 15 g |
| | Hefeextrakt | 3 g |
| | NaCl | 6 g |
| | Glucose | 1 g |
| MM2C | 4x Salz (steril filtriert) | 250 ml |
| | C-Quelle (Glucose, Sorbitol, Glycerin...) 20% (steril) | 50 ml |
| | H ₂ O (steril) | 700 ml |
| | ----- | |
| | <u>4x Salz (500 ml, steril filtriert):</u> | |
| | Asparagin | 8 g |
| | K ₂ HPO ₄ | 2 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| | MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1 M) | 1,6 ml |
| | NaCl | 6 g |
| | Nikotinsäure (20 mg /ml, pH 7,1) | 20 ml |
| | Thiamin / Cl | 0,4 g |

2.5.1.2 Antibiotika

Je nach Bedarf wurden die Medien mit Antibiotika zur Selektion versetzt. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Eingesetzte Antibiotika.

| Antibiotikum | Stocklösung | Lösungsmittel | Endkonzentration |
|---------------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Streptomycin | 500 mg /ml | H ₂ O | 500 µg / ml |
| Rifampicin | 25 mg /ml | DMSO | 75 µg / ml |
| Kanamycin | 20 mg /ml | H ₂ O | 20 µg / ml |
| Ampicillin | 100 mg /ml | H ₂ O | 100 µg / ml |

2. Material und Methoden

2.5.2 Lagerungsversuche mit Trockenprodukten der Antagonisten

Die von der ABiTEP GmbH zur Verfügung gestellten Trockenformulierungen von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurden auf vier Aliquots (à ca. 4 g) verteilt sowie trocken- und luftdicht verpackt. Die von der Firma angegebene cfu / g wurde zum Zeitpunkt t_0 über die Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ) überprüft. Dazu wurde eine definierte Menge des Trockenproduktes mit einer Konzentration von 10 mg / ml in H₂O angesetzt und 200 µl in das erste Well einer 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe (Gesamtvolumen: 200 µl) in sterilem H₂O in der 96-Well Mikrotiterplatte angelegt. Jeweils 5 µl Suspension der Verdünnungen wurden mit der Multikanalpipette in dreifacher Wiederholung auf eine St. I - Platte getropft und vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Platten bei 28°C inkubiert bis eindeutige Einzelkolonien erkennbar waren. Die Verdünnungsstufen in einem Bereich von eins bis ca. 50 Kolonien je Tropfen wurden gezählt und die cfu anschließend auf die Dichte der Stocklösung zurückgerechnet. Für den Lagerungsversuch wurde je ein Aliquot bei RT, 4°C, -20°C und -80°C gelagert. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurde monatlich eine definierte Menge des Pulvers abgewogen und in sterilem H₂O gelöst (10 mg / ml) und die LZZ wie oben beschrieben bestimmt. Die Anzahl an Verdünnungsstufen richtete sich nach der zum Zeitpunkt t_x erwarteten Zellzahl. Um Abweichungen auswerten zu können, wurden Verdünnungen in einem Bereich von mindestens 1×10^2 cfu bis 1×10^3 cfu über und unter der erwarteten Zellzahl einbezogen. Nach Bestimmung der cfu / ml wurde auf cfu / g Pulver zurückgerechnet und die Entwicklung der LZZ in der Trockenformulierung dokumentiert.

2.5.3 Aufzeichnung von Wachstumskurven

Die Aufzeichnung von Wachstumskurven erfolgte in transparenten 96-Well Mikrotiterplatten in einem Gesamtvolumen von 200 µl je Well. Als Inokulum wurden entweder Zellen aus einer flüssigen Vorkultur oder aus der Trockenformulierung verwendet. Das Inokulum wurde auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und 1:500 in Medium vorverdünnt. 100 µl der Bakteriensuspension wurde in das erste Well pipettiert. In die übrigen Wells wurden 100 µl Medium vorgelegt und anschließend über die 96-Well Mikrotiterplatte eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt, um abnehmende Inokulumdichten zu erhalten. Pro Zelldichte wurde mindestens eine Wiederholung angelegt. Als Kontrolle wurden 200 µl LB verwendet. Die Inkubation der Platte im Platerreader erfolgte bei 28°C und 200 rpm. Die Messung der Absorption bei OD₆₀₀ in 30 min Intervallen erfolgte mit einer Kinetik aus 200 Zyklen mit einer Dauer von 1835 s je Zyklus.

2. Material und Methoden

2.5.4 Bestimmung der Korrelation zwischen Lumineszenz und Zellwachstum des Reporterstammes Ea 1/79 pfdC1Z'-lux

Eine Übernachtskultur von Ea 1/79 pfdC1Z'-lux wurde in 10 ml LB + Km angeimpft und über Nacht bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml der Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 (entspricht 1x10⁹ cfu / ml) eingestellt und 1:500 in LB verdünnt. In einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte mit transparentem Boden wurden 100 µl LB vorgelegt und 100 µl des Inokulums zugegeben, sodass eine Enddichte von 1x10⁶ cfu / ml in einem Gesamtvolumen von 200 µl vorlag. Als Kontrolle wurden 200 µl LB verwendet. Die Platte wurde unter Schütteln bei 200 rpm und 28°C im Platereader inkubiert und parallel über die Gerätesoftware im Script Mode in 30 min Intervallen die Absorption bei OD₆₀₀ und die relative Lumineszenz gemessen. Die Kinetik sah 200 Zyklen mit einer Länge von 1800 s vor. Die Messung wurde in der stationären Wachstumsphase beendet.

2.5.5 Qualitativer Nachweis zur Adhäsion an Oberflächen

Bakterienkolonien wurden von einer ein bis zwei Tage alten Agarplatte abgenommen und in sterilem H₂O resuspendiert. Nach Messung der OD₆₀₀ wurde die Suspension auf eine OD₆₀₀ von 1 in 1 ml eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf eine OD₆₀₀ von 0,05 in LB verdünnt. In eine 12-Well Mikrotiterplatte wurden 3 ml der Bakteriensuspension pro Well vorgelegt. Ein mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziertes Deckgläschen (18x18 mm) wurde anschließend schräg in je ein Well gestellt, sodass etwa 1/2 bis 1/3 der Fläche mit Kultur benetzt war. Als Kontrolle wurde LB verwendet. Die Multiwellplatte wurde bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette im nicht-benetzen Bereich gepackt und aus der Kultur genommen. Nicht angeheftete Zellen wurden mit H₂O abgespült. Anschließend wurden die angehefteten Zellen mit 0,1% (w/v) Kristallviolett für 15 min bei RT eingefärbt. Um überschüssiges Färbemittel zu entfernen, wurden die Deckgläschen vier Mal mit frischem H₂O gewaschen und die Deckgläschen auf Zellstoff getrocknet. Das Maß an angehefteten Zellen wurde optisch ausgewertet.

2.5.6 Quantitative Bestimmung der Adhäsion an Oberflächen

Für eine quantitative Bestimmung der Adhäsion wurde eine Übernachtskultur der zu testenden Stämme in 10 ml LB angesetzt und bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ gemessen und 1 ml Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt.

2. Material und Methoden

Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf eine OD_{600} von 0,05 in LB verdünnt und davon je 200 μ l in zwei 96-Well Mikrotiterplatten gegeben. Pro Variante wurden zwei Reihen à acht Wiederholungen angelegt. Als Negativkontrolle wurde LB verwendet. Die Platte wurde im Brutschrank bei 28°C für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kultur vorsichtig mit der Pipette abgenommen und 300 μ l H_2O zum Waschen in die Wells pipettiert. Nachdem das Wasser abgenommen wurde, wurden 300 μ l 0,1% (w/v) Kristallviolettlösung zugegeben und die Platte für 15 min bei RT inkubiert. Das Färbemittel wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Wells vier Mal mit 300 μ l H_2O gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 300 μ l 99% (v/v) EtOH zugegeben, um das Kristallviolett aus den gefärbten Zellen zu lösen. Um die Menge an Kristallviolett zu bestimmen wurde die Absorption bei 600 nm gemessen und zwischen den getesteten Stämmen verglichen.

2.5.7 Nachweis zur Stärkespaltung mit Kaliumjodid

Für Stärkeplatten wurde LB-Agar mit 0,5% (w/v) Stärke versetzt. Die Platte wurde in zwei gleichgroße Bereiche aufgeteilt. Auf einer Hälfte wurde *B. amyloliquefaciens* FZB2 und auf der anderen Hälfte *E. amylovora* 1/79 ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte über Nacht bei 28°C wurde die Platte mit 0,5% Iod-Kaliumiodidlösung behandelt. Iod und Kaliumjodid wurden dafür in einem Mischungsverhältnis von 1:2 in H_2O angesetzt. Durch die Einlagerung des Iods in die Stärkemoleküle, färbt sich die Stärke im Agar in einer bräunlichen Farbe. Bereiche in denen die Stärke von dem Organismus abgebaut wurde, bleiben ungefärbt.

2.6 Hemmversuche

2.6.1 Agar-Diffusionstest

Für den Agar-Diffusionstest wurde ein Weichagar aus 1,5% (w/v) Agar in H_2O angesetzt, autoklaviert und anschließend in 50 ml Aliquots aliquotiert. Der Weichagar wurde auf ca. 42°C temperiert, um ein Festwerden zu vermeiden und die *Erwinia* Zellen bei Zugabe nicht abzutöten. Zellen von Ea 1/79 pfdC1Z'-lux wurden entweder von einer ein bis zwei Tage alten Agarplatte resuspendiert oder aus einer flüssigen Vorkultur auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. 500 μ l der Bakteriensuspension wurden zu 50 ml Weichagar gegeben, sodass eine Zelldichte von ca. 1×10^6 cfu / ml vorlag. Etwa 2,5 ml Weichagar mit Ea 1/79 pfdC1Z'-lux wurden verwendet, um LB + Km Agarplatten zu beschichten. Durch leichtes Schwenken der Platten beim Gießen des Weichagars sollte eine homogene Verteilung der Zellen erzielt werden.

2. Material und Methoden

Nach dem Festwerden des zugegebenen Agars wurde die Platte in vier bis acht gleichgroße Bereiche eingeteilt. Die zu testenden Hemmstoffe wurden jeweils als einzelner 5 µl Tropfen auf einen abgegrenzten Bereich der Platte gegeben. Pro Variante wurden mindestens drei Platten angesetzt. Die in dieser Arbeit getesteten Toxine von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 wurden mit einer Konzentration von 0,1 g / ml in H₂O suspendiert. Dieser Versuchsansatz erlaubt die Diffusion der Hemmstoffe in den Agar und bildet ein Konzentrationsgefälle innerhalb der Platte. Nach Inkubation über Nacht bei 28°C kann die Platte auf Bakterienwachstum untersucht werden. Die Bereiche, in denen keine Trübung durch Wachstum von Ea 1/79 pfdC1Z'-lux ersichtlich ist (Hemmhöfe), besitzen ausreichend Hemmstoff um das Wachstum des Pathogens zu unterdrücken. Der Durchmesser der Hemmhöfe erlaubt eine Einschätzung zwischen der Effektivität verschiedener Stoffe. Um Trübungseffekte von eingesetzten Hemmstoffen zu umgehen, wurde das Wachstum von Ea 1/79 pfdC1Z'-lux zusätzlich mit Hilfe der Lumineszenz des Reporterstammes überprüft.

2.6.2 Ko-Kultivierung von *E. amylovora* und bakteriellen Antagonisten

Die Hemmwirkung von Antagonisten auf *E. amylovora* wurde über die Ko-Kultivierung von Antagonist und Pathogen untersucht. Für die Versuche wurde ein lumineszierender *E. amylovora* Stamm (Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux) eingesetzt. Dieser enthält ein Plasmid auf dem das *lux* Operon aus *Vibrio fischeri* unter Kontrolle eines Lac-Promotors kloniert wurde und das alle notwendigen Gene für die Lichtproduktion in Bakterien besitzt. Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation eines reduzierten Flavinmoleküls und eines langkettigen Aldehyds. Unter Energieverbrauch wird bei dieser Reaktion Licht einer Wellenlänge von 490 nm abgegeben: $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + h\nu$. Bei der Synthese des langkettigen Aldehyds spielt ein Fettsäure-Reduktase-Komplex eine essentielle Rolle, dessen Komponenten NADPH- und ATP-abhängig sind (Dunlap 2014). Von Antagonist und Pathogen wurde eine 10 ml Kultur in LB angesetzt und über Nacht bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ gemessen und 1 ml Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Die Antagonistensuspension wurde 1:50 in LB vorverdünnt und 200 µl in das erste Well einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. In den übrigen Wells wurden 100 µl LB vorgelegt. Dann wurde mit der Multikanalpipette, ausgehend vom ersten Well, eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt, sodass abnehmende cfu pro ml des Antagonisten vorlagen.

2. Material und Methoden

Von der Kultur des Reporterstammes Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux wurde 1 ml Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und anschließend 1:500 in LB verdünnt. Von der Pathogensuspension wurden 100 µl zu der Mikrotiterplatte gegeben, sodass in jedem Well eine Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux Enddichte von 1×10^6 cfu / ml vorlag. Das Gesamtvolumen in der Mikrotiterplatte betrug somit 200 µl. Je nach Anzahl der in der Mikrotiterplatte angelegten Verdünnungen ergaben sich unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Antagonist zu Pathogen im Inokulum (10:1, 5:1, 2,5:1, 1,25:1, 1:1,6, 1:3,2, 1:6,4 bis 1:12,8). Als Kontrollen dienten Reinkulturen der eingesetzten Organismen, sowie LB. Pro Variante wurde mindestens eine Wiederholung angelegt. Die Inkubation der Platte erfolgte unter Schütteln bei 200 rpm und 28°C im Platereader. In 30 min Intervallen wurde die relative Lumineszenz in den einzelnen Wells gemessen. Die Kinetik entsprach bis zu 50 Zyklen mit einer Dauer von 1800 s je Zyklus. Die Dauer der Messung richtete sich nach dem Kurvenverlauf.

2.6.2.1 Ko-Kultivierung von *E. amylovora* und bakteriellen Antagonisten bei 16°C

Die Vorkulturen und die 96-Well Mikrotiterplatte wurden analog zu dem Ko-Kultivierungsversuch in Abschnitt 2.6.2 angesetzt. Nach Inokulation der Platte am Vorabend wurde diese im Schüttler bei 16°C und 140 rpm inkubiert. Die Messung der relativen Lumineszenz des Reporterstammes Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux erfolgte als Endpunktbestimmung im Platereader nach Inkubation über Nacht in ca. 2 h Intervallen. Die Messung wurde so lange durchgeführt bis beim Kurvenverlauf Anstieg, Maximum und Abfall der relativen Lumineszenz beobachtet werden konnte.

2.6.3 Hemmversuche mit Kulturüberständen der Antagonisten

Für die Hemmversuche mit Kulturüberständen wurden am Vortag Übernachtkulturen der Antagonisten und des Pathogens in 10 ml LB angeimpft und auf dem Schüttler bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Am nächsten bzw. übernächsten Tag wurde der Überstand der Antagonistenkultur über Zentrifugation für 5 min bei fullspeed (hier: 20238 x g) und RT geerntet. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. 200 µl Überstand wurden in das erste Well einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. In den übrigen Wells wurden 100 µl LB + Km vorgelegt und anschließend mit der Multikanalpipette eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt, um abnehmende Konzentrationen des Überstandes zu testen. Die Zugabe des Antibiotikums im Medium sollte verhindern, dass die Hemmung des Pathogens durch zurückgebliebene Zellen im Überstand beeinflusst wird.

2. Material und Methoden

Pro Variante wurde je eine Reihe zur Wiederholung angesetzt. Von der Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux Übernachtskultur wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1:500 in LB + Km verdünnt und 100 µl des Pathogens in die Mikrotiterplatte pipettiert, sodass ein Endvolumen von 200 µl mit einer Dichte von 1×10^6 cfu / ml vorlag. Als Kontrolle wurde LB, sowie LB + Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux eingesetzt. Die Inkubation der Platte erfolgte unter Schütteln bei 200 rpm und 28°C im Platerader. In 30 min Intervallen wurde die relative Lumineszenz in den einzelnen Wells gemessen. Die Dauer der Messung hing von dem Kurvenverlauf ab. Die Kinetik entsprach bis zu 50 Zyklen mit einer Dauer von 1800 s je Zyklus.

2.6.4 Überprüfung der Hemmwirkung trockenformulierter Toxine

Analog zu dem Versuch zur Pathogenhemmung durch Antagonisten Kulturüberstände in Abschnitt 2.6.3., wurden die trockenformulierten Toxingemische der ABiTEP GmbH in einem Kultivierungsassay mit Ea 1/79 pfdC1Z'-lux getestet. Aufgrund des hohen Milchpulveranteils des Trockenproduktes und der damit einhergehenden starken Trübung, war die Messung der optischen Dichte nicht möglich. Daher wurde auch in diesem Ansatz der lumineszierende Reporterstamm Ea 1/79 pfdC1Z'-lux eingesetzt. Am Vortag wurde eine Übernachtskultur des Pathogens in 10 ml LB angesetzt und bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Zwei Stocklösungen der Toxine mit einer Konzentration von 1 mg / ml bzw. 200 mg / ml wurden in sterilem H₂O angesetzt und im ersten Well einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte 1:10 verdünnt. 100 µ LB + Km wurden in die übrigen Wells vorgelegt. Anschließend wurde, ausgehend vom ersten Well, eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt, um abnehmende Konzentration an Toxinen zu erreichen. Von der Ea 1/79 pfdC1Z'-lux Übernachtskultur wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml der Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Nach einer Vorverdünnung von 1:500 in LB + Km wurden jeweils 100 µl Pathogen in die Mikrotiterplatte pipettiert, sodass eine Enddichte von 1×10^6 cfu / ml in einem Gesamtvolumen von 200 µl vorlag. Als Kontrolle wurde LB, sowie LB + Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux eingesetzt. Die Inkubation der Platte wurde unter Schütteln bei 200 rpm und 28°C durchgeführt. In 30 min Intervallen wurde die relative Lumineszenz pro Well gemessen. Die Dauer der Messung hing von dem Kurvenverlauf ab. Die Kinetik entsprach bis zu 50 Zyklen mit einer Dauer von 1800 s je Zyklus.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Herstellung CaCl₂ kompetenter Zellen

Zur Herstellung Calcium-kompetenter Zellen wurde am Vortag eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α in 10 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ gemessen und 10 ml LB mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 140 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 erreicht war. 1 Volumen (V) der Kultur wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Kühlzentrifuge bei 4°C für 5 min bei fullspeed (hier: 18213 x g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 1 V sterilem, kaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und dann für ca. 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut bei 4°C für 5 min bei fullspeed zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. 1 V steriler, kalter 0,1 M CaCl₂ Lösung wurde zugegeben und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4°C und fullspeed wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 V steriler, kalter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und fullspeed. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 V steriler, kalter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und fullspeed wurde das Pellet in 1/20 V sterilem, kaltem 0,1 M CaCl₂ mit 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder in 50 μ l Aliquots bei -80°C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Kompetenz der Zellen wurde ein Kontrollplasmid (z.B. p3T) wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben transformiert.

2.7.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *Erwinia* Zellen wurden am Vortag Zellen auf St. I Agar ausgestrichen und bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde Zellmaterial von den frisch ausgestrichenen Platten in 2 ml sterilem H₂O resuspendiert und 5 min bei fullspeed (hier: 18213 x g) und 4°C zentrifugiert. In den folgenden Schritten wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Das Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem, sterilen H₂O aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei fullspeed und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und ein weiteres Mal wie bereits beschrieben zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 1 ml kaltem, sterilen 20% (v/v) Glycerin resuspendiert und für 5 min bei fullspeed und 4°C zentrifugiert.

2. Material und Methoden

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 1 ml kaltem, sterilen 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und für 5 min bei fullspeed und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ein weiteres Mal in 1 ml kaltem, sterilen 20% (v/v) Glycerin aufgenommen und für 5 min bei fullspeed und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in eiskaltem, sterilen 600 µl 20% (v/v) Glycerin resuspendiert. Um die Zellen auf ihre Kompetenz zu testen, wurde ein Kontrollplasmid (z.B. p3T) wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben transformiert.

2.7.3 Transformation von DNA

5 µl – 10 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng / µl Plasmid-DNA wurde zu 50 µl chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 bis 60 Sekunden im Thermocycler. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 min wurde der Transformationsansatz zu 1 ml LB gegeben und 1 - 2 h bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden gewachsene Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher auf eine neue Selektionsplatte gepickt.

2.7.4 Elektroporation

40 µl elektrokompetente Zellen wurden für die Elektroporation in vorgekühlte Küvetten überführt. Das Volumen der DNA variierte zwischen 0,7 µl bei Plasmiden und bis zu 5 µl bei Ligationen. Der Impuls wurde mit 25 µF, 800 Ohm und 2,5 kV ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml auf 28°C vorgewärmtes Komplexmedium überführt und 2 - 3 h bei 28°C inkubiert. Danach wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden gewachsene Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher auf eine neue Selektionsplatte gepickt.

2.7.5 Plasmidpräparation mittels Kit

Für die Präparation von Plasmiden mittels Kit wurde das FastGene® Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics) verwendet. Dafür wurden 1-5 ml Übernachtskultur (high copy Plasmide) bzw. 5-10 ml Übernachtskultur (low copy Plasmide) eingesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 1 min bei fullspeed (hier: 20238 x g) und RT pelletiert und in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach homogener Resuspension wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Inkubationszeit betrug 2 min bei RT.

2. Material und Methoden

Anschließend wurden 300 µl Neutralisierungspuffer dazupipettiert und erneut durch Invertieren gemischt. Danach wurde für 2 min bei fullspeed und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule gegeben und 30 s bei fullspeed zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 150 µl Waschpuffer 1 auf die Säule gegeben. Nach ca. 10 s Inkubationszeit wurden 300 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 3 min bei fullspeed und RT. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution wurden 20-50 µl H₂O eingesetzt. Nach Inkubation für 2 min wurde für weitere 2 min bei fullspeed und RT zentrifugiert, um die DNA von der Säule zu eluieren. Die Plasmide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.7.6 Plasmidpräparation über alkalische Lyse

1 ml einer LB Übernachtskultur wurde für 2 min bei fullspeed (hier: 20238 x g) und RT zentrifugiert. Das erhaltende Zellpellet wurde in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 150 µl Puffer P2 zugegeben und durch Invertieren gemischt, um die Zellen zu lysieren. Zur Ausfällung der Proteine wurden 150 µl Puffer P3 dazupipettiert und für 10 min bei und RT zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Na-Acetat sowie 0,6 V Isopropanol versetzt. Nach Invertieren der Probe wurde für 30 min bei fullspeed und RT zentrifugiert, um die ausgefällte DNA zu gewinnen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol für 15 min gewaschen. Der Alkohol wurde abgenommen, die DNA an der Luft getrocknet und dann in H₂O aufgenommen. In Tabelle 9 ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer aufgelistet.

Tabelle 9: Puffer zur Plasmidpräparation über alkalische Lyse.

| Puffer | Komponenten | Konzentration |
|---------------|-------------------------|----------------------|
| P1 | Tris / HCl pH 8 EDTA | 25 mM 10 mM |
| P2 | NaOH SDS | 200 mM 1% (w/v) |
| P3 | Kaliumacetat pH 5,2 | 3 M |

2. Material und Methoden

2.7.7 Ankonzentrierung von DNA

Zur Ankonzentrierung von DNA wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Zu der DNA wurden 2 V Ethanol (96% (v/v)) und 0,1 V Na-Acetat (3 M) gegeben und mindestens 1 h oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei fullspeed (hier: 18213 x g) und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70%-igem (v/v) Ethanol 15 min bei fullspeed und 4°C gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 10 - 50 µl H₂O aufgenommen.

2.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente der Amplifizierung von DNA. Tabelle 10 zeigt den Pipettieransatz und das standardmäßig verwendete PCR-Programm.

Tabelle 10: Übersicht über den PCR-Ansatz und das Standard PCR Programm.

| Komponente | Volumen [25 µl] | Programm | |
|--------------------------|-----------------|----------|------------|
| | | Temp. | Zeit [min] |
| Template | 1 | 95°C | 3:00 |
| 10x Puffer | 2,5 | 95°C | 0:20 |
| Primer (fwd.+ rev.) | 2 | 60°C | 0:30 |
| dNTPs | 1 | 72°C | 0:20 |
| H ₂ O | 18,4 | 72°C | 5:00 |
| Kappa Taq DNA Polymerase | 0,1 | 12°C | 5:00 |

Der Reaktionsansatz wurde je nach Versuch variiert und auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl oder 50 µl angepasst. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den verwendeten Primern, die Elongationszeit wurde nach der zu erwartenden Produktlänge (1000 bp / min) angepasst. Tabelle 11 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten 10x Puffers.

Tabelle 11: Zusammensetzung des 10x PCR-Puffers.

| Komponenten | Konzentration |
|---|---------------|
| Tris / Cl pH 8,7 | 200 mM |
| KCl | 200 mM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 100 mM |
| MgCl ₂ | 25 mM |

2. Material und Methoden

2.7.9 Agarose-Gelelektrophorese

Für den Gelauftrag wurde die DNA mit Gelladepuffer (Tabelle 12) versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel + Midori Green (4 µl / l) aufgetragen. Als Standard wurden 2 µl des GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladders (0,5 µg / µl) mit den Größen 75 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 7000 bp, 10000 bp, 20000 bp der Firma Thermo Scientific verwendet. Der Lauf erfolgte in der Regel für 30 min bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurde das Gel unter UV Licht beleuchtet und fotografiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des 6x Gelladepuffers.

| Komponenten | Konzentration |
|--------------------|----------------------|
| Tris / HCl pH 7,6 | 10 mM |
| Bromphenolblau | 0,03% |
| Xylen Cyanol FF | 0,03% |
| Glycerol | 60% |

2.7.10 PCR-Aufreinigung mittels Kit

Zur Aufreinigung von PCR Produkten mittels Kit wurde das FastGene® Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) verwendet. Dazu wurde 1 V PCR-Produkt mit 5 V Bindpuffer versetzt und durch Vortexen gemischt. Das Gemisch wurde auf eine Säule gegeben und für 30 s bei fullspeed (hier: 20238 x g) und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, zum Waschen 600 µl Waschpuffer zugegeben und für 30 s bei fullspeed und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule für 2 min bei fullspeed und RT trocken zentrifugiert. Zur Elution wurden 20-50 µl H₂O eingesetzt. Nach H₂O-Zugabe wurde für 2 min bei RT inkubiert und anschließend für 2 min fullspeed und RT die DNA eluiert.

2.7.11 Restriktionsverdau

Für die Restriktion von DNA wurden die Fast Digest Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und in folgendem Ansatz pipettiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ansatz zum Restriktionsverdau.

| Komponente | Volumen [10 µl] |
|------------------------|------------------------|
| DNA | 4 |
| 10x Fast Digest Puffer | 1 |
| Enzym | 0,5 |
| H ₂ O | 4,5 |

2. Material und Methoden

Der Verdau erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Die Inkubationszeit richtete sich nach der Art der verwendeten DNA. Plasmide wurden maximal 30 min verdaut und anschließend ein Aliquot wie in Abschnitt 2.7.9 beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen und der Verdau kontrolliert.

2.7.12 Ligation

Die Ligation von DNA Fragmenten in einen Vektor wurde nach dem Ansatz in Tabelle 14 pipettiert.

Tabelle 14: Ansatz zur Ligation von DNA Fragmenten.

| Komponente | Volumen [10 µl] |
|-------------------|------------------------|
| Vektor | 1 |
| Insert | 4 |
| 10x Ligase Puffer | 1 |
| T4 Ligase | 1 |
| H ₂ O | 3 |

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Deaktivierung der Ligase erfolgte am nächsten Tag durch 10 min Inkubation bei 65°C.

2.7.13 Herstellung der Komplementationsplasmide für Et 1/99 Sm *ymoB*:: Tn5_Km^R

Für die Klonierung der *ymo* Komplementationsplasmide wurden die Genbereiche *ymoB*, *ymoA* und *ymoBA* aus *E. amylovora* und *E. tasmaniensis* via PCR wie in Abschnitt 2.7.8 beschrieben amplifiziert. Zur Überprüfung der Produktgrößen wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. In Tabelle 15 sind die Primerkombinationen, der amplifizierte Genbereich sowie die Größen der PCR-Produkte aufgelistet.

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Primer und die Produktgrößen der *ymo*-PCR.

| Primerkombination | Genbereich | Größe [bp] |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
| Ea-ymo-f + Ea-ymo-r | <i>ymoBA</i> (Ea) | 927 |
| Ea-ymo-f + Ea-ymo-r1 | <i>ymoB</i> (Ea) | 642 |
| Ea-ymo-fl + Ea-ymo-r | <i>ymoA</i> (Ea) | 378 |
| Et-ymo-f + Et-ymo r1 | <i>ymoBA</i> (Et) | 893 |
| Et-ymo-f + Et-ymo r1 | <i>ymoB</i> (Et) | 591 |
| Et-ymo-fl + Et-ymo r | <i>ymoA</i> (Et) | 324 |

2. Material und Methoden

Die PCR Produkte wurden wie in Abschnitt 2.7.10 beschrieben über eine Säule gereinigt und mit dem Vektor p3T (3003 bp) für ein blau-weiß Screening ligiert. Der Aufbau des Plasmids ist in Abbildung 6A dargestellt. Die Ligation erfolgte mit dem *XcmI* / *PflMI* geöffneten Plasmid p3T und den jeweiligen Fragmenten (Abbildung 6B) wie in Abschnitt 2.7.12 beschrieben. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α (siehe Abschnitt 2.7.3). Der Ansatz wurde auf Selektionsplatten mit X-Gal + Amp ausplattiert. Der Ampicillin Hintergrund des Plasmids ermöglicht eine Selektion der Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben. Der Farbstoff in der Platte dient einem blau-weiß Screening über die auf dem Plasmid kodierte β -Galaktosidase. Plasmide, in denen das PCR-Produkt in den Vektor ligiert wurde, sollten in der Expression des Enzyms gestört sein und auf der Platte weiß erscheinen. Weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf frische Agarplatten mit X-Gal + Amp gepickt und parallel in 1 ml LB + Amp Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 140 rpm. Anschließend wurden die Plasmide wie in den Abschnitten 2.7.5 bzw. 2.7.6 isoliert und zur Kontrolle der Vektor- und Insertgrößen ein Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.11). Die Orientierung des Inserts wurde mit dem jeweiligen reverse Primer des Inserts und den Primern M13F1 bzw. M13R2 überprüft.

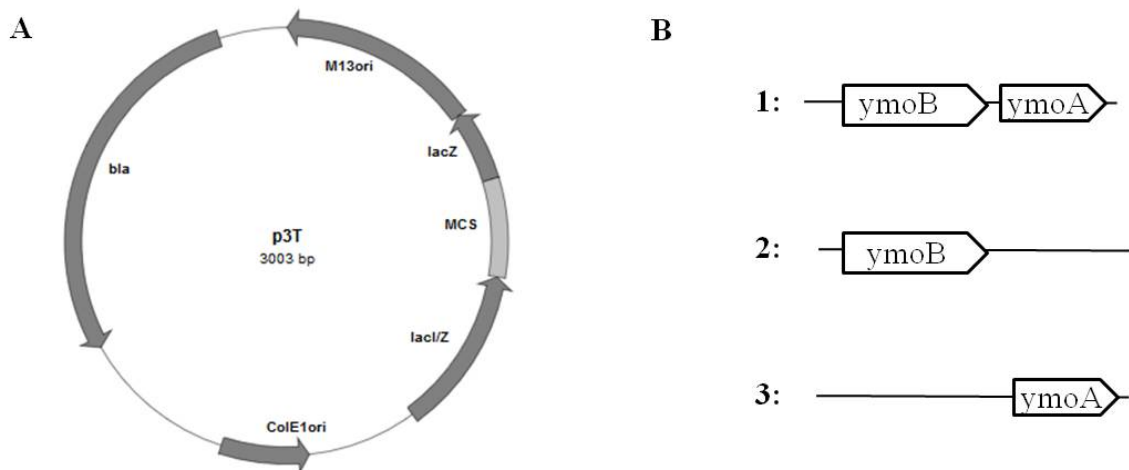


Abbildung 6: Aufbau des Klonierungsplasmids p3T (A) und eine schematische Übersicht über die eingebrachten Gene aus *E. amylovora* 1/79 bzw. *E. tasmaniensis* 1/99 (B). Ampicillinresistenz (bla), *origin of replication* (ColE1 ori) M13ori, lacZ Promotor, Betagalaktosidase Promotorsequenz (lacI), Alphapeptid der Beta-Galaktosidase (lacZ), *multiple cloning site* geschnitten mit *PflMI* und *XcmI*.

Für die Komplementation der Mutante *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Km^R_Tn5 wurden die Plasmide wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben via Elektroporation in elektrokompente Zellen der *E. tasmaniensis* 1/99Sm *ymoB*::Km^R_Tn5 Mutante transformiert.

2. Material und Methoden

Die Transformation wurde auf LB + Km + Amp ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher auf eine frische LB + Km + Amp Agarplatte gepickt und nach Inkubation über Nacht bei 28°C auf Einzelkolonien ausgestrichen. Die Phänotypen der komplementierten Zellen wurden analysiert und mit der Mutante verglichen.

2.8 Pflanzenversuche

2.8.1 Apfelblütenassay

2.8.1.1 Wirkung von Antagonisten gegen *E. amylovora* auf der Blüte

Für den Apfelblütenassay wurden frisch blühende Apfelblüten von Topfbäumchen aus dem Gewächshaus entnommen. 2 ml Reaktionsgefäße wurden mit H₂O gefüllt und mit Aluminiumfolie abgedeckt. Nach dem Einstechen eines kleinen Loches in die Aluminiumfolie, wurde von den Blüten der untere Teil des Stiels abgeknipst und anschließend in die Reaktionsgefäße gestellt. Zur Behandlung der Blüten mit den Antagonisten wurde aus dem Trockenprodukt eine Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 1×10^8 cfu / ml in H₂O angesetzt. Die Blüten wurden möglichst gleichmäßig mit einem Handsprüher besprüht. Anschließend wurden die Blüten unter dem Abzug getrocknet, bis keine Tropfen mehr zu sehen waren. Für die Infektion wurde eine Bakteriensuspension von *E. amylovora* auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Dazu wurde entweder Zellmaterial von einer ein bis zwei Tage alten Agarplatte verwendet oder Zellen aus einer Übernachtskultur. Die Pathogensuspension wurde auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und die Zellen anschließend verdünnt, sodass ca. 500 cfu / 5 µl vorlagen. Mit der Pipette wurden je 5 µl vorsichtig auf den Blütenboden der einzelnen Blüten gegeben. Die Blüten wurden in einer mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Plastikbox fünf bis sieben Tage bei RT inkubiert und auf Symptombildung untersucht. Als Kontrolle wurden zwei unbehandelte Kontrollen verwendet. Bei diesen wurde *E. amylovora* (Positivkontrolle) oder H₂O (Negativkontrolle) auf den Blütenboden pipetiert.

2.8.1.2 Bestimmung der Bakterienzellzahl auf der Blüte

Um die Bakterienzahl auf der Blüte zu bestimmen, wurden die Blüten analog zu Abschnitt 2.8.1.1 behandelt. Die Dichte der Sprühsuspension variierte zwischen 1×10^8 cfu / ml und 1×10^5 cfu / ml. Je nach Versuchsaufbau wurden von drei bis zehn Einzelblüten die Stiele abgeschnitten und die Blüte in 1 ml H₂O für 10 min auf dem Kleinschüttler (1000 rpm) gewaschen.

2. Material und Methoden

Die Blüte wurde verworfen und von der Waschprobe in einer 96-Well Mikrotiterplatte eine 1:10 Verdünnungsreihe (Volumen: 200 µl) angelegt. Bis zu zwölf Verdünnungen wurden mit der Multikanalpipette à 5 µl Tropfen in drei Wiederholungen auf St. I- bzw. eine Selektionsplatte getropft. Nach dem Trocknen wurden die Platten über Nacht bei 28°C inkubiert. Die Verdünnungsstufen im Bereich von eins bis ca. 50 Kolonien je Tropfen wurden gezählt und die cfu / Blüte berechnet. Um die Entwicklung der Bakterien auf der Blüte zu untersuchen, wurden die cfu / Blüte in verschiedenen Zeitverläufen untersucht.

2.8.1.3 Bestimmung des Sporenanteils auf der Blüte

Zur Bestimmung des Sporenanteils von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte wurde ein Aliquot der Blüten-Waschprobe für 10 min bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde wie in Abschnitt 2.8.1.2 beschrieben eine Verdünnungsreihe angelegt und getropft. Die Verdünnungsstufen im Bereich von eins bis ca. 50 Kolonien je Tropfen wurden gezählt und die cfu / Blüte berechnet. Im Vergleich mit der Gesamtzellzahl aus der nicht-erhitzten Probe konnte so der Anteil der Sporen auf der Blüte bestimmt werden.

2.8.2 Birnenscheibenassay

2.8.2.1 96-Well Screening von Feuerbrandantagonisten auf Birnenscheiben

Die Birnen wurden in Walnussgröße geerntet und in Gefrierbeutel verpackt bei 4°C aufbewahrt. Für den Assay im 96-Well Format wurden die Birnen in 0,5 bis 1,0 cm dicke Scheiben geschnitten und anschließend mit einem Korkbohrer in kleinere Scheiben ausgestanzt (Durchmesser ca. 0,3 mm). Die so enthaltenen „Disks“ wurden zur Desinfektion vorsichtig in 5% (v/v) H₂O₂ getaucht und zum Trocknen auf Zellstoff gegeben. Anschließend wurden die Disks auf eine 96-Well Mikrotiterplatte verteilt.

Von dem Antagonist wurden 48 Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher auf eine Agarplatte gepickt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen von zwei Platten mit einem Metallstempel in eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 200 µl sterilem H₂O überführt und resuspendiert. In einer weiteren 96-Well Mikrotiterplatte wurde die Bakteriensuspension 1:10 in sterilem H₂O verdünnt. Je 10 µl der Antagonistensuspension wurde mittig auf die ausgestanzten Disks gegeben. Von einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222_JKI pKAN wurde die OD₆₀₀ bestimmt und auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Das Inokulum wurde in H₂O verdünnt, sodass beim Pipettieren von 5 µl auf die Birne pro Disk ca. 5000 cfu vorlagen. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation in einer mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Plastikbox wurde im Platerader die Fluoreszenz im Well-Scan Mode in einer 5x5 Matrix gemessen.

2. Material und Methoden

2.8.3 *In vitro* Pflanzen

In vitro Pflanzen der Apfelsorte Pinova wurden für Adhäsions- und Infektionsversuche verwendet.

2.8.3.1 Adhäsionsversuche auf *in vitro* Pflanzen

Am Vortag des Versuches wurde eine Übernachtskultur der Antagonisten in 10 ml LB angesetzt. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml Kultur auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Anschließend wurde der Antagonist auf eine Dichte von 1×10^8 cfu / ml in H₂O verdünnt. Ca. 8 cm große Pflanzen wurden gleichmäßig mit einem Handsprüher mit der Antagonistensuspension besprüht. Pro Ansatz wurden jeweils fünf Pflanzen verwendet. Die Inkubation erfolgte in geschlossenen Plastikbechern bei RT. Täglich wurden je fünf Blätter pro Ansatz entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäßen abgewogen. Pro mg wurden 100 µl steriles H₂O zugegeben. Die Proben wurden für 10 min auf dem Kleinschüttler bei 1000 rpm gewaschen. Von der Waschprobe wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe in einer 96-Well Mikrotiterplatte angelegt und 5 µl der Suspension in dreifacher Wiederholung auf Agarplatten getropft. Die Platten wurden über Nacht bei 28°C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien in einem Bereich von eins bis 50 gezählt. Abschließend wurde die cfu pro Blatt berechnet.

2.9 Freilandversuche in Mannheim / Kirschgartshausen

2.9.1 Feuerbrandbekämpfungsversuch

Der Bekämpfungsversuch richtete sich nach der EPPO Richtlinie (PP1/166-3) (beschrieben in Kapitel 1.5) und wurde an dreijährigen Apfelbäumen der Sorte Gala auf der Unterlage M9 in Mannheim / Kirschgartshausen durchgeführt. Pro Behandlungsvariante standen jeweils vier Parzellen mit acht bis zehn Bäumen zur Verfügung. Die Trocken- bzw. Flüssigprodukte der Antagonisten wurden im Vorfeld aliquotiert, sodass eine Dichte von 1×10^8 cfu / ml vorlag. Zur Behandlung der Bäume wurden die Varianten in Tanks mit einem Fassungsvermögen von 30 Litern in H₂O angesetzt und die Bäume gleichmäßig besprüht. Der mittlere Baum, sowie die beiden äußeren Bäume einer jeden Parzelle wurden 1 - 2 h nach der Behandlung mit dem Feuerbranderreger infiziert. Dazu wurde ein Stammgemisch aus besonders aggressiven *E. amylovora* Stämmen mit einer Dichte von 1×10^8 cfu / ml gesprüht. Zur Bonitur wurden die vorhandenen Blütenbüschel einzeln bewertet und der Anteil an infizierten und nicht-infizierten Clustern bestimmt. Die Bonitur der primär infizierten Bäume erfolgte etwa zwei Wochen nach Versuchsbeginn. Die sekundär infizierten Bäume wurden etwa vier Wochen nach Versuchsbeginn bonitiert. Zur

2. Material und Methoden

anschließenden Auswertung wurde der Befall in der Anlage sowie der Wirkungsgrad der getesteten Formulierungen nach den nachfolgenden Formeln berechnet:

$$\text{Befall [\%]} = (I / \text{Gesamtclusteranzahl}) \times \text{Anzahl befallene Büschel}$$

$$\text{Wirkungsgrad} = 1 - (\% \text{ Befall} / \% \text{ Befall in unbehandelt})$$

2.9.2 Untersuchungen zur Ausbreitung und Etablierung der Antagonisten im Freiland

In der Versuchsanlage Kirschgartshausen wurden ausgewählte Bäume mit frisch geöffneten Blüten der Sorte Gala markiert und mit den Antagonisten (1×10^8 cfu / ml) per Sprühen inokuliert. Über einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen wurden in wöchentlichen Abständen bis zu zehn Blüten pro Baum gesammelt. Diese wurden einzeln für 10 min in 1 ml sterilem H₂O / Blüte auf dem Kleinschüttler bei ca. 1000 rpm gewaschen. 1 ml LB wurde mit 100 µl der Blütenwaschprobe angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Die restliche Waschprobe wurde mit Glycerin versetzt (Endkonzentration: 20% (v/v)) und bis zu weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Am nächsten Morgen wurden der Übernachtskultur Glycerin zugesetzt (Endkonzentration: 20% (v/v)) und bei -80°C eingefroren.

2.9.2.1 PCR-Nachweis von *E. tasmaniensis*

Sowohl von den Waschproben, als auch von den in Abschnitt 2.9.2 beschriebenen Übernachtskulturen wurde ein Lysat mit 0,1% Tween 20 hergestellt. Dazu wurden 50 µl Tween 20 mit 10 µl Probe versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Die als Template eingesetzte DNA wurde in der Regel 1:10 verdünnt und dann wie in Abschnitt 2.7.8 beschrieben amplifiziert. Mit der DNA aus den Waschproben wurden verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:100, 1:200) getestet. Die Sequenz und Bindestellen der Nachweisprimer ETPSGL4124 und ETPSGL4760c sind in Tabelle 6 aufgelistet. Das PCR Produkt weist eine Größe von 637 bp auf. Als Positivkontrolle wurde ein Tween-Lysat von *E. tasmaniensis* 1/99 eingesetzt.

2.9.2.2 Nachweis von *Bacillus* über Bestimmung der LZZ auf Selektionsmedium

Der Nachweis von *B. amyloliquefaciens* FZB42 erfolgte über Bestimmung der *Bacillus* cfu / Blüte. Dazu wurde 2015 mit einem Isolat gearbeitet, das eine Spontanmutation zur Rifampicinresistenz aufweist. Von den in Kirschgartshausen gesammelten Blütenproben wurden 100 µl der Waschprobe auf LB + Rif ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert.

2. Material und Methoden

Von den Blüten, die im Vorfeld mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif behandelt wurden, wurde außerdem eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung der Waschprobe plattiert. Am nächsten Tag wurden die *Bacillus* Kolonien auf den Platten gezählt und die cfu / Blüte berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierungsexperimente mit *E. amylovora*

3.1.1 Korrelation zwischen Wachstum und Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux

Um Antagonist und Pathogen in einer Ko-Kultur voneinander unterscheiden zu können, wurde ein lumineszierender Reporterstamm von *E. amylovora* eingesetzt. Dieser ermöglicht eine indirekte Bestimmung der Zellaktivität des Pathogens (Bogs et al. 1998). Die Korrelation zwischen dem Wachstum und der Abgabe von Biolumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux wurde zunächst unter den vorhandenen Versuchsbedingungen untersucht. Abbildung 7 zeigt, dass nach ca. 6 h Inkubation, mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, ein Anstieg der rel. Lumineszenz zu beobachten war. Diese nahm mit dem Anstieg der Zelldichte zu und erreichte nach 12,5 h ihr Maximum von ca. 120000 rel. Lumineszenzeinheiten. Anschließend fiel die Lumineszenz wieder ab, während die Zelldichte konstant bei einer OD₆₀₀ von ~ 1,0 blieb.

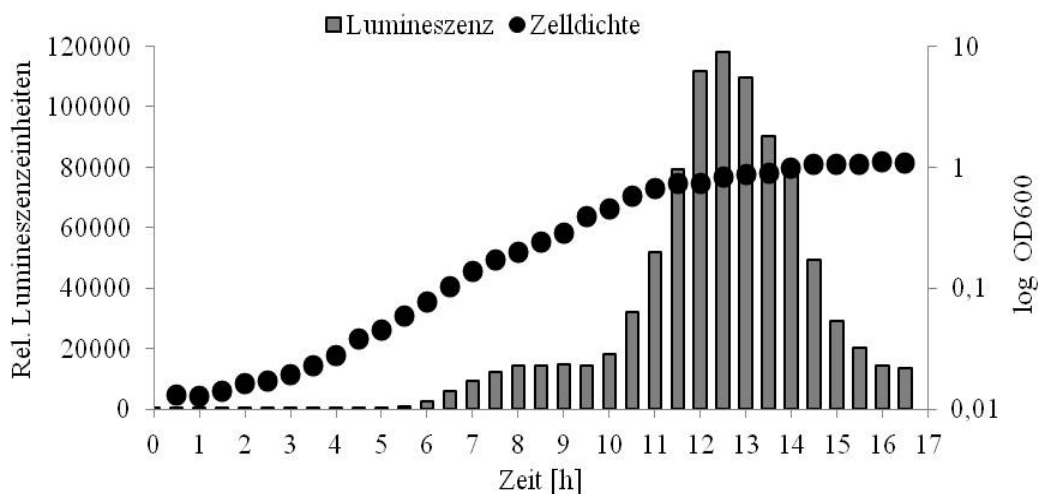


Abbildung 7: Korrelation von Wachstum und Biolumineszenz des Reporterstammes *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux. Eine frische Übernachtskultur von Ea 1/79 pfdC1Z'-lux wurde verwendet, um 200 µl LB in einer Mikrotiterplatte mit einer Startdichte von 1×10^6 cfu / ml anzupflanzen. Die Kultur wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 16,5 h wurden im Platerreader die Absorption bei OD₆₀₀ (Kreis) und die relative Lumineszenz (Säule) gemessen. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit der gleichen Tendenz.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, korreliert der Anstieg der Lumineszenz mit der Zunahme der Zelldichte von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux in der exponentiellen Phase. Die maximale Intensität wurde über einen Zeitraum von ca. 1,5 h aufrechterhalten, bevor es zu einem Abfall der rel. Lumineszenz nach dem Eintritt in die stationäre Phase kam.

3. Ergebnisse

3.1.2 Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch *E. tasmaniensis* DS08

Wie in Abschnitt 3.1.1 gezeigt, korreliert das Wachstum des Reporterstammes *E. amylovora* 1/79 pfdC1Z'-lux über die Dauer der exponentiellen Phase mit der abgegebenen Biolumineszenz. Um die Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 als Biokontrollorganismus gegen den Feuerbranderreger zu testen, wurde die Hemmung des Reporterstammes *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch den Antagonisten in dem in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Ko-Kultivierungsassay überprüft. Als Kontrolle wurde eine Reinkultur von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux eingesetzt. Um die Effektivität der Hemmung von *E. tasmaniensis* DS08 auf *E. amylovora* zu testen, wurden Ko-Kulturen aus Antagonist und Pathogen in verschiedenen Mischungsverhältnissen angeimpft (Abbildung 8).

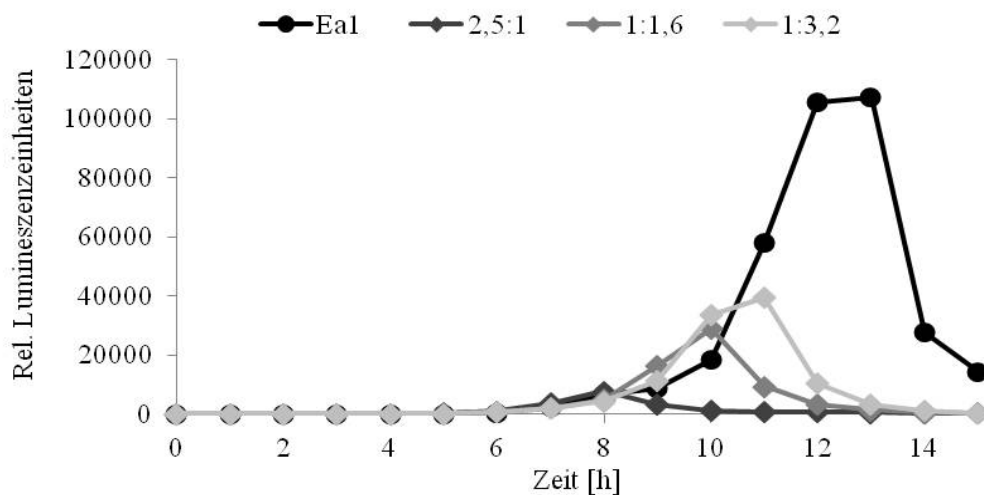


Abbildung 8: Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch *E. tasmaniensis* DS08. Eine frische Übernachtskultur von Et DS08 wurde verwendet, um 100 μ l LB in einer Mikrotiterplatte mit einer Startdichte von 2×10^7 cfu / ml anzupflanzen. In der Mikrotiterplatte wurde dann eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB angelegt und nach Zugabe von 1×10^6 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux in einem Gesamtvolumen von 200 μ l bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 15 h wurde im Platerreader die rel. Lumineszenz gemessen. Gezeigt sind die Mischungsverhältnisse im Inokulum von 2,5:1; 1:1,6 und 1:3,2 von Et DS08 (Raute) zu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux. Als Kontrolle wurde eine Reinkultur von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux (Kreis) eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit gleicher Tendenz.

Die Reinkultur von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux erreichte unter den getesteten Bedingungen nach ca. 13 h Inkubation ein Maximum von 110000 rel. Lumineszenzeinheiten. Die Ko-Kultivierung des Pathogens mit *E. tasmaniensis* DS08 führte in allen getesteten Varianten zu einer deutlichen Reduzierung der maximalen Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux. Bei Inokulation mit 2,5 Teilen Antagonist zu einem Teil des pathogenen Reporterstammes wurden nach 8 h Inkubation mit ca. 8000 rel. Lumineszenzeinheiten lediglich 6% der maximalen Lumineszenz der Kontrolle erreicht.

3. Ergebnisse

Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1,6 (Antagonist zu Pathogen) im Inokulum lag die rel. Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei 30000 rel. Einheiten zum Zeitpunkt $t = 10$ h und erreichte damit 23% der maximalen Lumineszenz der Kontrolle. Bei Inokulation mit 3,2 Teilen Pathogen zu einem Teil Antagonist lag die rel. Lumineszenz mit ca. 40000 Einheiten bei ca. 32% der maximalen Lumineszenz in der Kontrolle ($t = 11$ h).

3.1.3 Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch *B. amyloliquefaciens* FZB42

Parallel wurde auch die Hemmwirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 mit dem in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Ko-Kultivierungsassay überprüft. Verglichen wurden Inokulumgemische von Antagonist zu Pathogen im Verhältnis von 2,5:1, 1:1,6 und 1:3,2 mit der Kontrolle von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux in Reinkultur (Abbildung 9).

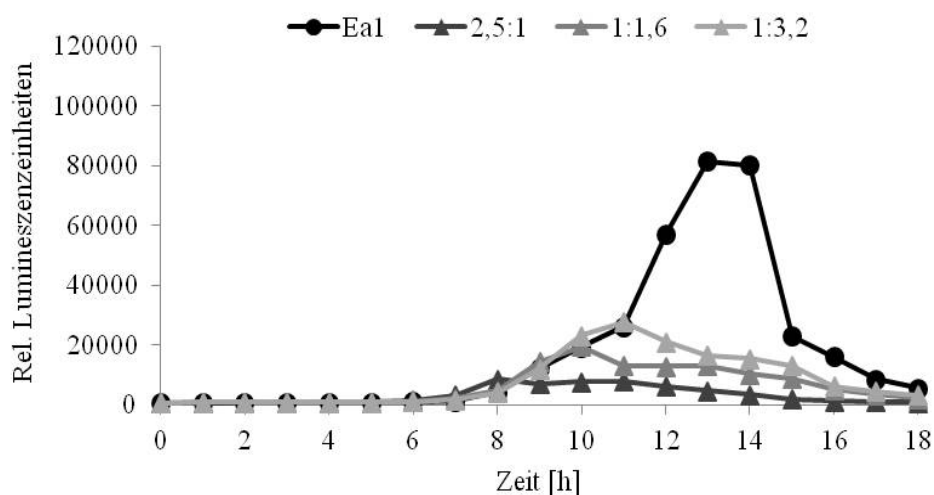


Abbildung 9: Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch *B. amyloliquefaciens* FZB42. Eine frische Übernachtskultur von Ba FZB42 wurde verwendet, um 100 μ l LB in einer Mikrotiterplatte mit einer Startdichte von 2×10^7 cfu / ml anzupflanzen. In der Mikrotiterplatte wurde dann eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB angelegt und nach Zugabe von 1×10^6 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux in einem Gesamtvolumen von 200 μ l bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 18 h wurde im Platerreader die relative Lumineszenz gemessen. Gezeigt sind die Mischungsverhältnisse im Inokulum von 2,5:1, 1:1,6 und 1:3,2 von Ba FZB42 (Dreieck) zu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux. Als Kontrolle wurde eine Reinkultur von Ea 1/79 pfdC1-Z' lux (Kreis) eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit gleicher Tendenz.

Die Kontrolle erreichte auch in diesem Ansatz nach ca. 13 h Inkubation ihre maximale Lumineszenz. Die rel. Lumineszenz lag mit ca. 82000 Einheiten etwas niedriger als bei dem Versuch mit *E. tasmaniensis* DS08 (siehe Abschnitt 3.1.2). Auch die Ko-Kultivierung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 führte in allen getesteten Varianten zu einer Reduzierung der Lumineszenz des Reporterstammes.

3. Ergebnisse

Bei einem Inokulum mit einem Überschuss von 2,5 Anteilen Antagonist zu einem Teil Pathogen wurden nach 8 h Inkubation mit 9000 rel. Lumineszenzeinheiten lediglich 9% der maximalen Lumineszenz der Kontrolle erreicht. Bei einem Inokulum mit einem Mischungsverhältnis von 1:1,6 von Antagonist zu Pathogen lag die maximale rel. Lumineszenz des Reporterstammes bei 20000 Einheiten nach 10 h Inkubation. Dieser Wert entspricht etwa 21% der maximalen Lumineszenz der Kontrolle. Bei einem Inokulum mit 3,2 Teilen Pathogen zu einem Teil Antagonist lag die Lumineszenz etwas höher bei 28000 rel. Lumineszenzeinheiten ($t = 11$ h), was 29% der maximalen Lumineszenz in der Kontrolle entspricht.

3.1.4 Hemmwirkung diverser Bazillen auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux

Verschiedene Arten aus der Gattung *Bacillus* wurden auf ihre antagonistische Wirkung auf den Feuerbranderreger *E. amylovora* untersucht. Wie in den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 zu sehen, führte die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von wirksamen Antagonisten zu einer Verschiebung der Wachstumskurve. Damit einhergehend wurde die maximale Lumineszenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht. Im Folgenden wurde die maximale Lumineszenz der Ko-Kulturen als Anteil gegen die Kontrolle von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux in Reinkultur (= 100%) verglichen. Abbildung 10 zeigt die maximale Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei der Ko-Kultivierung mit Stämmen der Art *B. amyloliquefaciens* (FV 11-1, FV 11-6, Abi 01, Abi 125, Gao B2, FZB42) sowie *B. subtilis ssp. spizizenii* (Stamm 2), *B. mojavensis* (Stamm 7) und *B. subtilis ssp. subtilis* (Stamm 8, Stamm 12) im Vergleich. Als Inokulum wurden Mischungsverhältnisse von Antagonist zu Pathogen von 2:1, 1:1 und 1:2 getestet. Innerhalb der Art *B. amyloliquefaciens* ließen sich kaum Unterschiede in der Hemmwirkung der verschiedenen Isolate erkennen. Die Stämme FV 11-1, FV 11-6, Abi 01 und Abi 125 waren in ihrer Wirkung auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux gleich effektiv. Die Lumineszenz lag bei maximal 14% ($\pm 2\%$ bis 8%) der Kontrolle bei einem Verhältnis von 1:2 (Antagonist zu Pathogen) im Inokulum. Die Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 lag in einem ähnlichen Bereich. Bei einem Verhältnis von 1:2 von Antagonist zu Pathogen im Inokulum lag die Lumineszenz des Reporterstammes bei 21% ($\pm 7\%$) der Kontrolle. Innerhalb der *B. amyloliquefaciens* Stämme zeigte Gao B2 die schwächste Wirkung. Bei einem Inokulum mit 2 Teilen Antagonist zu einem Teil Pathogen lag die maximale Lumineszenz bei 19% ($\pm 4\%$) der Kontrolle. Bei einem Überschuss von 2 Teilen *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux im Inokulum stieg die maximale Lumineszenz auf 30% ($\pm 7\%$) der Kontrolle.

3. Ergebnisse

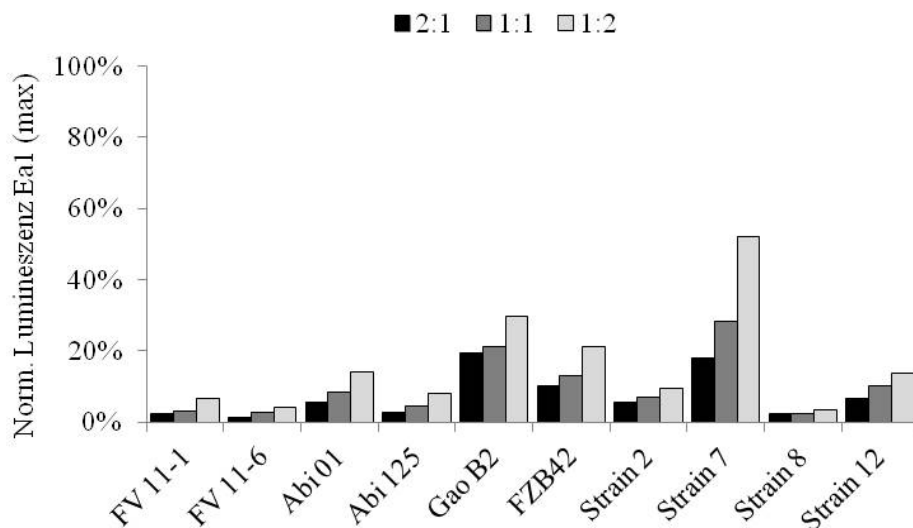


Abbildung 10: Maximale Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei Ko-Kultivierung mit verschiedenen *Bacillus* Arten. Frische Übernachtskulturen von verschiedenen *Bacillus* Isolaten wurden verwendet, um 100 μ l LB in einer Mikrotiterplatte mit einer Startdichte von 4×10^6 cfu / ml anzupflanzen. In der Mikrotiterplatte wurde dann eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB angelegt und nach Zugabe von 1×10^6 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1Z'-lux in einem Gesamtvolumen von 200 μ l bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von mindestens 22 h wurde im Platerreader die rel. Lumineszenz gemessen. In der Grafik sind die Mischungsverhältnisse von 2:1, 1:1 und 1:2 von Antagonist zu Pathogen im Inokulum zu sehen. Als Kontrolle diente eine Reinkultur von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux. Dargestellt ist die maximal erreichte Lumineszenz der Ko-Kultur normalisiert gegen die Kontrolle (= 100%). Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit gleicher Tendenz.

Neben den Stämmen der Art *B. amyloliquefaciens* zeigten auch Stämme von *B. subtilis* eine Hemmwirkung auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux in Ko-Kultivierung. Von den getesteten Stämmen zeigten Stamm 2, Stamm 8 und Stamm 12 vergleichbare Hemmwirkungen. Bei einem Überschuss von 2 Teilen Pathogen im Inokulum lag die maximale Lumineszenz bei 14% ($\pm 1\%$ bis 5%) der Kontrolle. Stamm 7 zeigte hingegen eine deutlich verminderte Hemmwirkung auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux. Bei einem Verhältnis von 2 Teilen Pathogen zu einem Teil Antagonist im Inokulum lagen ca. 50% ($\pm 11\%$) der maximalen Lumineszenz der Kontrolle vor.

3.1.5 Wirkung der Kulturüberstände von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux

Es wurden verschiedene Wirkungsmechanismen beschrieben, die bakterielle Antagonisten zur Hemmung eines Pathogen nutzen. Dazu gehört u.a. die Bildung von Toxinen (siehe Kapitel 1.3.1.2). Die Kulturüberstände von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurden auf eine mögliche Hemmwirkung überprüft.

3. Ergebnisse

Dazu wurden die Überstände von Übernachtskulturen der Antagonisten, wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben, geerntet und in Mikrotiterplatte ein Hemmtest mit dem Reporterstamm *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durchgeführt. Ein Vergleich der Hemmwirkung durch die Kulturüberstände von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 ist in Abbildung 11 dargestellt.

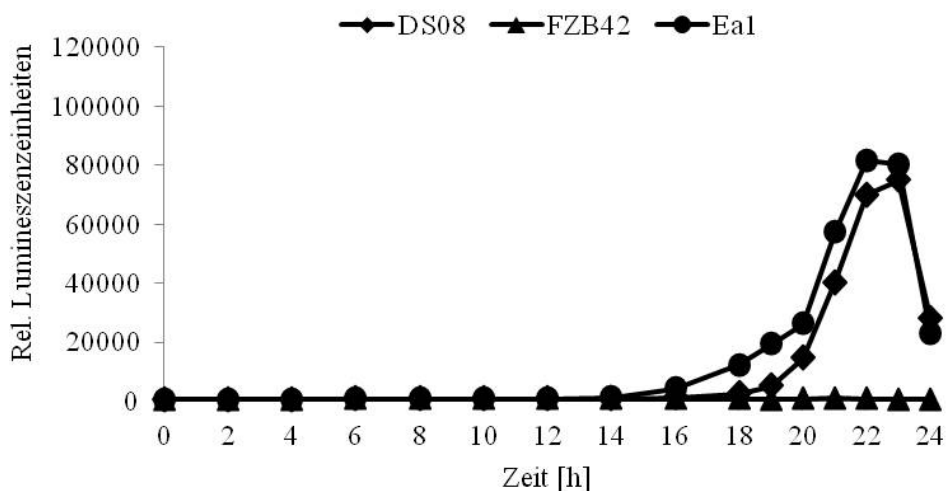


Abbildung 11: Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch Kulturüberstände von *E. tasmaniensis* DS08 bzw. *B. amyloliquifaciens* FZB42. Die Überstände frischer 10 ml Übernachtskulturen von Et DS08 und Ba FZB42 wurden durch Zentrifugation geerntet. In einer Mikrotiterplatte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der ungefilterten Überstände in LB + Km angelegt, um verschiedene Konzentrationen der Überstände zu testen. Nach Zugabe von 1×10^6 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux wurde ein Gesamtvolumen von 200 μ l bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 24 h wurde im Platereader die relative Lumineszenz gemessen. Gezeigt ist der Einfluss des 1:4 verdünnten Überstandes von Et DS08 (Raute) bzw. Ba FZB42 (Dreieck) auf Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Kontrolle von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux (Kreis) eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit gleicher Tendenz.

Eine unbehandelte Kontrolle von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux wies unter den getesteten Bedingungen nach 22 h Inkubation eine maximale Lumineszenz mit 82000 rel. Lumineszenzeinheiten auf. Eine 1:4 Verdünnung des Kulturüberstandes von *E. tasmaniensis* DS08 hatte einen minimalen Effekt auf das Pathogen und zeigte eine rel. Lumineszenz des Reporterstammes von ca. 75000 Einheiten (t = 23 h), was 92% der maximalen Lumineszenz in der unbehandelten Kontrolle entspricht. Im Gegensatz dazu konnte bei der Kultivierung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux unter Zugabe einer 1:4 Verdünnung des Kulturüberstandes von *B. amyloliquifaciens* FZB42 keine Lumineszenz gemessen werden. Um die Hemmwirkung der Toxine genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen der Überstände eingesetzt. Ein Vergleich der Lumineszenzmaxima von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux unter Zugabe von Kulturüberständen von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 ist in Tabelle 16 dargestellt.

3. Ergebnisse

Tabelle 16: Normierte maximale Lumineszenz einer *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux Kultur versetzt mit Überständen (Ü) von *E. tasmaniensis* DS08 bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Prozent). Die Überstände von frischen Übernachtskulturen von Et DS08 und Ba FZB42 wurden durch Zentrifugation geerntet. In einer Mikrotiterplatte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe Überstände in LB + Km angelegt, um den Einfluss der 1:2 bis 1:64 verdünnten Überstände auf Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux zu testen. Die Kultur mit einem Gesamtvolumen von 200 µl wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert und über einen Zeitraum von 20 h im Platerader die relative Lumineszenz gemessen. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Kontrolle von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux eingesetzt. Dargestellt ist die maximal erreichte Lumineszenz normalisiert gegen die Kontrolle (= 100%). Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

| Kulturüberstand Verdünnung | Norm. Lumineszenz (%) Ea1 + Ü DS08 | Norm. Lumineszenz (%) Ea1 + Ü FZB42 |
|---------------------------------------|---|--|
| 1:2 | 29 ± 9 | 3 ± 4 |
| 1:4 | 88 ± 7 | 3 ± 4 |
| 1:8 | 123 ± 7 | 4 ± 4 |
| 1:16 | 135 ± 11 | 7 ± 6 |
| 1:32 | 133 ± 4 | 15 ± 11 |
| 1:64 | 126 ± 3 | 23 ± 13 |

Der Einsatz einer 1:2 Verdünnung des Kulturüberstandes von *E. tasmaniensis* DS08 führte im Mittel zu einer Reduktion der maximalen Lumineszenz des pathogenen Reporterstammes auf ca. 29% der unbehandelten Kontrolle. Bereits im nächsten Verdünnungsschritt (1:4) war die Hemmung fast vollständig aufgehoben. Die maximale Lumineszenz lag bei ca. 88% der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz zu Überständen von *E. tasmaniensis* DS08 erreichten die Überstände von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auch bei höheren Verdünnungen eine deutliche Hemmwirkung. In der 1:8 Verdünnung lag die maximale Lumineszenz bei ca. 4% der unbehandelten Kontrolle. In der 1:32 Verdünnung wurden ca. 15% der maximalen Lumineszenz der unbehandelten Kontrolle erreicht. Höhere Verdünnungsstufen führten zu einem Anstieg der maximalen Lumineszenz. Erst ab einer Verdünnung des Überstandes von 1:512 lag keine Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux mehr vor (nicht gezeigt).

3.1.6 Wirkung von Kulturüberständen in Abhängigkeit vom Erntezeitpunkt

Wie in Abschnitt 3.1.5 gezeigt wurde, haben Komponenten aus dem Kulturüberstand von *B. amyloliquefaciens* FZB42 eine direkte Hemmwirkung auf *E. amylovora*. Dies bestätigte die Wirkung der in Kapitel 1.3.1.2 beschriebenen Toxine von *B. amyloliquefaciens* FZB42. Unterschiede zwischen verschiedenen Arten, die die Praxistauglichkeit der Antagonisten beeinflussen können, wurde in einem weiteren Hemmtest untersucht.

3. Ergebnisse

Dazu wurden Kulturüberstände eingesetzt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der stationären Wachstumsphase geerntet wurden. Tabelle 17 zeigt den Vergleich der maximalen Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei Kultivierung mit Überständen von *B. amyloliquefaciens* Abi 125, *B. amyloliquefaciens* FV 11-6 und *B. mojavensis* Stamm 7. Die Überstände wurden nach einer oder zwei Nächten Kultivierung geerntet.

Tabelle 17: Lumineszenz einer *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux Kultur mit Überständen (Ü) von *B. amyloliquefaciens* Abi 125 und *B. mojavensis* Stamm 7 (Prozent). Die Überstände von Abi 125, FV 11-6 und Stamm 7 wurden nach ein (T1) bzw. zwei (T2) Tagen Kultivierung geerntet. In einer Mikrotiterplatte wurde 100 µl einer 1:10 Verdünnung der Überstände vorgelegt und eine 1:10 Verdünnungsreihe in LB + Km angelegt, um den Einfluss der 1:20 bis 1:80 verdünnten Überstände auf Ea 1/79 pfdC1Z'-lux zu testen. Die Kultur mit einem Gesamtvolumen von 200 µl wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert. Über einen Zeitraum von mindestens 20 h wurde im Platerader die relative Lumineszenz gemessen. Zur Kontrolle wurde eine unbehandelte Kontrolle von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux eingesetzt. Dargestellt ist die maximal erreichte Lumineszenz normalisiert gegen die Kontrolle (= 100%). Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen und der Standardabweichung.

| Verdünnung | Norm. Lumineszenz (%) Ea1 + Ü Abi 125 | | Norm. Lumineszenz (%) Ea1 + Ü Stamm 7 | |
|-------------|--|---------|--|---------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| 1:10 | 0 ± 0 | 6 ± 8 | 17 ± 4 | 11 ± 16 |
| 1:20 | 0 ± 0 | 22 ± 18 | 88 ± 4 | 29 ± 29 |
| 1:40 | 2 ± 1 | 34 ± 25 | 103 ± 17 | 57 ± 26 |
| 1:80 | 6 ± 4 | 41 ± 23 | 107 ± 21 | 70 ± 22 |

Die nach einem Tag Inkubation geernteten Überstände von *B. amyloliquefaciens* Abi 125 und *B. amyloliquefaciens* FV 11-6 zeigten unter den getesteten Bedingungen bei einer Verdünnung von 1:80 noch eine fast vollständige Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux (maximal 6% der Lumineszenz der unbehandelten Kontrolle). Erfolgte die Ernte nach zwei Tagen Inkubation nahm die Hemmwirkung der Kulturüberstände von *B. amyloliquefaciens* deutlich ab. Bei der Zugabe einer 1:20 Verdünnung des Überstandes lag die maximale Lumineszenz bei 22% der unbehandelten Kontrolle. Bei einer Verdünnung von 1:80 lag die maximale Lumineszenz bei 41% der unbehandelten Kontrolle. Im Vergleich dazu zeigte der Kulturüberstand von Stamm 7 eine bessere Wirkung, wenn die Ernte des Überstandes nach 2 Tagen Kultivierung erfolgte. Während bei einer Verdünnung von 1:10 die maximale Lumineszenz des Reporterstammes zwischen 17% (Ernte nach einem Tag) und 11% (Ernte nach zwei Tagen) der unbehandelten Kontrolle lag, zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:40 ein deutlicher Unterschied.

3. Ergebnisse

Der nach einem Tag Kultivierung geerntete Überstand zeigte keinen Hemmeffekt auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux, während die Zugabe von Überstand des späteren Erntezeitpunktes zu einer maximalen Lumineszenz von ca. 60% der unbehandelten Kontrolle führten.

3.1.7 Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und thermotoleranten Bazillen

Die Temperatur im Freiland liegt im Frühjahr in einem Temperaturbereich, der für antagonistische Bazillen nicht in einem optimalen Bereich liegt. Die optimale Wachstumstemperatur von *B. amyloliquefaciens* FZB42 liegt beispielsweise zwischen 30 bis 40°C (Priest et al., 1987). Die Temperaturbedingungen im Feld können daher einen entscheidenden Einfluss auf die Hemmwirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 haben. Um dies zu überprüfen wurde ein Ko-Kultivierungsassay mit *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei einer Inkubationstemperatur von 16°C durchgeführt. Diese Temperatur liegt in einem wahrscheinlichen Bereich für die Freilandbedingungen im Frühjahr.

Im Vergleich zu *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurden außerdem *Bacillus* Arten untersucht, die auch bei Temperaturen zwischen 4°C und 10°C sehr gut wachsen können. Dabei handelte es sich um *B. atropheus* GBSC56 (GBSC), *B. pumilus* N6 (N6) und *B. simplex* R41 (R41) (ABiTEP GmbH). In Abbildung 12 sind die Lumineszenzmaxima von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux normiert zur Kontrolle der Reinkultur (= 100%) in einem Ko-Kultivierungsversuch mit *B. amyloliquefaciens* FZB42, *B. atropheus* GBSC, *B. pumilus* N6 und *B. simplex* R41 gezeigt. Getestet wurden Mischungsverhältnisse im Inokulum von Antagonist zu Pathogen von 2,5:1, 1,25:1 und 1:1,6. Bei der Inkubation bei 16°C nahm die Hemmwirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 im Vergleich zu den Versuchen bei 28°C (Abbildung 6B) deutlich ab. Selbst bei einem 2,5-fachen Überschuss an Antagonist im Inokulum lag die Lumineszenz bei ca. 84% (\pm 13%) der maximalen Lumineszenz der Kontrolle. In einem ähnlichen Bereich lag die maximale Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei der Ko-Kultivierung mit *B. atropheus* GBSC. Bei 2,5 Teilen Antagonist zu einem Teil Pathogen lag die maximale Lumineszenz bei 68% (\pm 12%). Bei einem Teil Antagonist zu 1,6 Anteilen Pathogen lag die Lumineszenz des Reporterstammes bei 96% (\pm 11%) der Kontrolle. Unter den getesteten Bedingungen zeigte *B. pumilus* N6 die beste Hemmwirkung auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux. Bei der Ko-Kultivierung lag die maximale Lumineszenz bei einem 2,5-fachen Überschuss an Antagonist bei 43% (\pm 5%) der Kontrolle und bei einem 1,6-fach höheren Anteil an Pathogen im Inokulum bei 73% (\pm 13%). *B. simplex* R41 zeigte unabhängig vom Mischungsverhältnis von Antagonist zu Pathogen eine konstante Hemmwirkung von ca. 50% (\pm 4%).

3. Ergebnisse

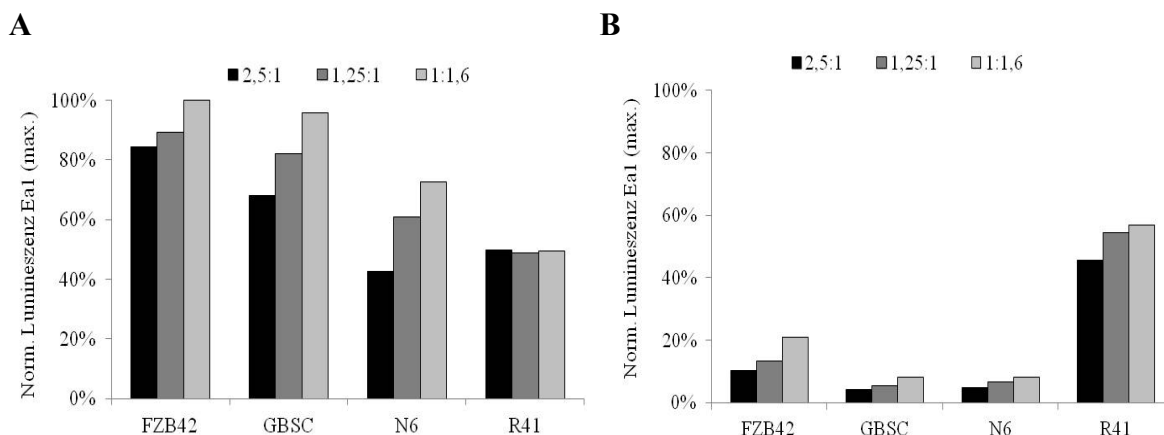


Abbildung 12: Maximale Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei Ko-Kultivierung mit thermotoleranten *Bacillus* Arten bei 16°C (A) und 28°C (B). Frische Übernachtskulturen von verschiedenen *Bacillus* Arten wurden verwendet, um 100 µl LB in einer Mikrotiterplatte mit einer Startdichte von 2×10^7 cfu / ml im ersten Well anzuimpfen. In der Mikrotiterplatte wurde dann eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB angelegt und nach Zugabe von 1×10^6 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux ein Gesamtvolumen von 200 µl bei 200 rpm und 16°C bzw. 28°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Reinkultur von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux verwendet. Die Grafik zeigt die maximal erreichte Lumineszenz der Ko-Kultur normalisiert gegen die Kontrolle (= 100%) bei Mischungsverhältnissen von 2,5:1, 1,25:1 und 1:1,6 der *Bacillus* Isolate zu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux im Inokulum. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit der gleichen Tendenz. A: Nach Inkubation über Nacht wurde in zwei Stunden Intervallen die relative Lumineszenz gemessen, bis die maximale Lumineszenz erreicht und ein Abfall des Kurvenverlaufs beobachtet wurde. B: Über einen Zeitraum von 15 h wurde in 30 min Intervallen im Platerreader die relative Lumineszenz gemessen.

Die Hemmwirkung der kältetoleranten Stämme gegenüber *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurde auch bei 28°C verglichen (Abbildung 12B). Bei der Ko-Kultivierung mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 erreichte *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei einem Inokulumgemisch von 1:1,6 von Antagonist zu Pathogen eine maximale Lumineszenz von etwa 26% ($\pm 7\%$) der Kontrolle. *B. atropheus* GBSC und *B. pumilus* N6 erreichten eine Reduzierung der maximalen Lumineszenz auf 4% ($\pm 3\%$) der Kontrolle bei einem Inokulumgemisch mit einem Überschuss von 2,5 Teilen Antagonist bzw. bis 8% ($\pm 8\%$) der Kontrolle bei einem Inokulumgemisch von einem Teil Antagonist zu 1,6 Teilen Pathogen. Die Wirkung von *B. simplex* R41 bei 28°C ist vergleichbar mit der bei 16°C (siehe Abbildung 12A). Die maximal gemessene Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei der Ko-Kultivierung mit *B. simplex* R41 erreichte bei den hier getesteten Mischungsverhältnissen Werte zwischen 46% ($\pm 5\%$) und 57% ($\pm 7\%$) der Kontrolle.

3. Ergebnisse

3.2 Formulierung bakterieller Antagonisten

3.2.1 Wachstum von Zellen aus Flüssigkultur und Trockenformulierung

Um zu überprüfen, inwiefern die Formulierung der Antagonisten einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen nimmt, wurde das Wachstum von Zellen aus dem Trockenprodukt mit dem aus einer flüssigen Vorkultur verglichen. Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Wachstumskurven von *E. tasmaniensis* DS08 (Abbildung 13A) und *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Abbildung 13B) aus einer flüssigen Vorkultur und dem Trockenprodukt bei Kultivierung in Komplexmedium.

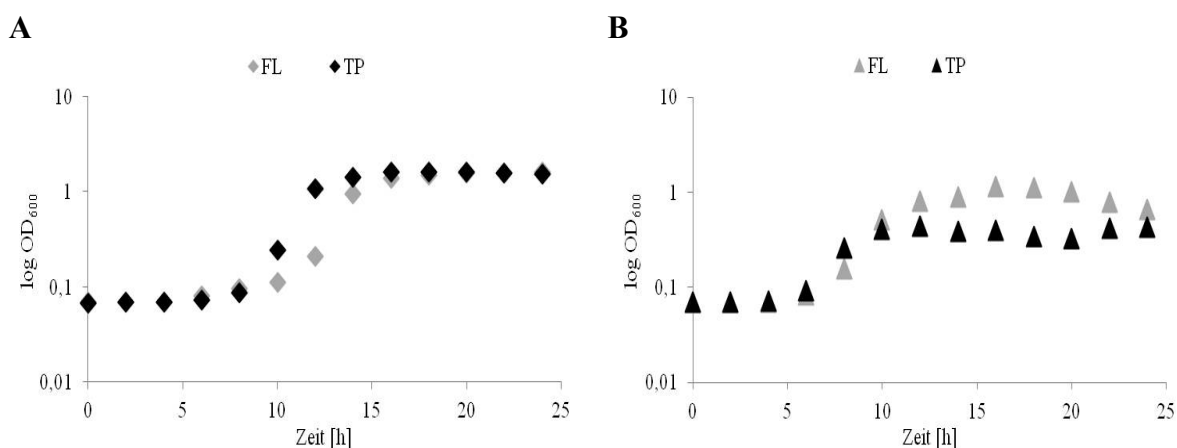


Abbildung 13: Wachstumskurven von Kulturen inokuliert aus frischer Vorkultur gegenüber dem Trockenprodukt von *E. tasmaniensis* DS08 (A) und *B. amyloliquefaciens* FZB42 (B) in LB. Von einer frischen Übernachtkultur bzw. mit den Trockenformulierungen wurden 100 µl LB mit einer Startdichte von 2×10^6 cfu / ml im ersten Well angeimpft. In einer Mikrotiterplatte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB angelegt, um verschiedene cfu Dichten zu testen. In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert und über einen Zeitraum von 25 h im Platerreader die OD₆₀₀ gemessen. Gezeigt sind die Wachstumskurven von Et DS08 (Raute) und Ba FZB42 (Dreieck) mit einer Startdichte von $1,25 \times 10^5$ cfu / ml. Die mit Flüssigkultur (FL) angeimpften Kulturen sind in grau, die aus Trockenprodukt (TP) gestarteten Kulturen in schwarz dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit der gleichen Tendenz.

Unabhängig vom eingesetzten Inokulum erreichten beide *E. tasmaniensis* DS08 Kulturen nach ca. 17 h Inkubation die gleiche Enddichte von $OD_{600} \sim 1,6$ (Abbildung 13A). Die Formulierung von *E. tasmaniensis* DS08 enthielt einen Nährstoffzusatz, wodurch ein stärkerer Anstieg nach Eintritt in die exponentielle Phase ($t = 10$ h) im Vergleich zur Kultur aus frischem Inokulum zu beobachten war. Dies spiegelte sich auch in den Verdopplungszeiten beider Kulturen wieder. Diese lagen bei der aus flüssiger Vorkultur angeimpften Kultur bei 41 min, während die mit Trockenprodukt inokulierte Kultur eine Verdopplungszeit von 34 min aufwies.

3. Ergebnisse

Im Vergleich dazu sind in Abbildung 13B die Wachstumskurven aus einer flüssigen Vorkultur von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und dem trockenformulierten Sporenprodukt in Komplexmedium dargestellt. Die Inokulation mit einer Sporenformulierung führte zu keiner verlängerten lag-Phase, sondern war mit der mit frischem Inokulum gestarteten Kultur vergleichbar. Beide erreichten nach ca. 6 h die exponentielle Phase. Die Verdopplungszeiten lagen bei 67 min (frische Vorkultur) bzw. 72 min (Trockenprodukt). Die Kultur mit frischem Inokulum erreichte mit einer $OD_{600} \sim 0,65$ eine höhere Enddichte, als die des Trockenproduktes ($OD_{600} \sim 0,43$). Beide Enddichten lagen deutlich niedriger als die von *E. tasmaniensis* DS08 (Abbildung 13A).

Beide Inokulumquellen wurden auch in Minimalmedium getestet. Abbildung 14 zeigt die Wachstumskurven von *E. tasmaniensis* DS08 (Abbildung 14A) und *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Abbildung 14B) bei Kultivierung in MM2C.

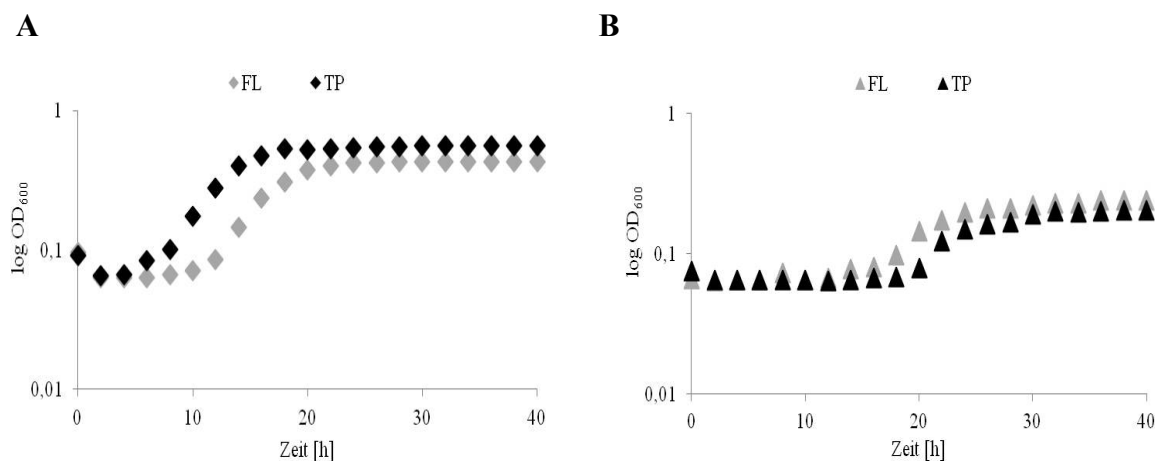


Abbildung 14: Wachstumskurven von Kulturen inokuliert aus frischer Vorkultur gegenüber dem Trockenprodukt von *E. tasmaniensis* DS08 (A) und *B. amyloliquefaciens* FZB42 (B) in MM2C. Von einer frischen Übernachtskultur bzw. mit den Trockenformulierungen wurden 100 μ l MM2C mit einer Startdichte von 2×10^6 cfu / ml im ersten Well angeimpft. In einer Mikrotiterplatte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in MM2C angelegt, um verschiedene cfu Dichten zu testen. Das Gesamtvolumen von 200 μ l wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert und über einen Zeitraum von 40 h im Platereader die OD_{600} gemessen. Gezeigt sind die Wachstumskurven von Et DS08 (Raute) und Ba FZB42 (Dreieck) mit einer Startdichte von $1,25 \times 10^5$ cfu / ml. Die mit Flüssigkultur (FL) angeimpften Kulturen sind in grau, die aus Trockenprodukt (TP) gestarteten Kulturen sind in schwarz dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen mit der gleichen Tendenz.

Auch unter diesen Bedingungen wies die Kultur aus der Trockenformulierung von *E. tasmaniensis* DS08 mit dem Nährstoffzusatz einen stärkeren Anstieg in der exponentiellen Phase auf als die Kultur aus frischem Inokulum. Der Übergang von der lag- in die exponentielle Phase erfolgte nach ca. 7 h (Trockenprodukt) bzw. ca. 12 h (frische Vorkultur). Die Verdopplungszeiten lagen bei 136 min bzw. 159 min. Die maximale optische Dichte lag bei dem Trockenprodukt bei $OD_{600} \sim 0,55$ und damit etwas höher als der Ansatz aus

3. Ergebnisse

der flüssigen Vorkultur ($OD_{600} \sim 0,43$) und erreichte nach etwa 20 h Inkubation das Maximum.

Bei der Anzucht in Minimalmedium ließ sich bei der Kultivierung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 erst nach 14 h ein Anstieg der OD_{600} beobachten. Unter den getesteten Bedingungen erreichte die Kultur aus frischem Inokulum den Übergang in die exponentielle Phase nach ca. 18 h. Die Verdopplungszeit von *B. amyloliquefaciens* FZB42 aus der frischen Vorkultur lag bei 158 min. Die Zellen aus dem Trockenprodukt verdoppelten sich alle 181 min. Der Anstieg in der Zelldichte war nur gering und erreichte in beiden Fällen ein Maximum von $OD_{600} \sim 1,5$ nach etwa 35 h Kultivierung.

3.2.2 Lagerfähigkeit von formulierten Antagonisten

Um die Trockenprodukte von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf ihre Haltbarkeit zu untersuchen, wurden die Produktmuster aliquotiert und bei RT, 4°C, -20°C und -80°C gelagert. In monatlichen Abständen wurden Lebendzellzahl in den Aliquots bestimmt (siehe Kapitel 2.5.2). Tabelle 18 zeigt eine Übersicht über die Entwicklung der Lebendzellzahl von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42.

Tabelle 18: Überblick über die Lagerstabilität der Trockenformulierungen von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 bei verschiedenen Lagertemperaturen. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurden monatlich 10 mg / ml Trockenprodukt in H₂O aufgenommen und in einer 1:2 Verdünnungsreihe auf LB Agar plattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 28°C wurde die cfu / g bestimmt. Gezeigt sind die cfu / g Trockenprodukt bei unterschiedlichen Lagertemperaturen in Test-Abständen von sechs Monaten.

| Antagonist / Lagerung | | Start | 6 Monate | 1 Jahr | 1,5 Jahre | 2 Jahre |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| DS08 | RT | 4×10^{11} | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4°C | 4×10^{11} | 7×10^{10} | 2×10^8 | 0 | 0 |
| | -20°C | 4×10^{11} | 1×10^{12} | 2×10^{11} | 4×10^{11} | 1×10^{11} |
| | -80°C | 4×10^{11} | 7×10^{11} | 3×10^{11} | 6×10^{11} | 1×10^{12} |
| FZB42 | RT | 5×10^{11} | 3×10^{11} | 1×10^{12} | 2×10^{11} | 2×10^{11} |
| | 4°C | 5×10^{11} | 3×10^{11} | 3×10^{12} | 1×10^{11} | 3×10^{11} |
| | -20°C | 5×10^{11} | 3×10^{11} | 3×10^{10} | 2×10^{11} | 4×10^{11} |
| | -80°C | 5×10^{11} | 3×10^{12} | 2×10^{11} | 6×10^{11} | 3×10^{11} |

3. Ergebnisse

Die Versuche zeigten, dass das Produktmuster von *E. tasmaniensis* DS08 bei der Lagerung bei Raumtemperatur schon nach sechs Monaten keine lebenden Zellen mehr aufwies. Die Lagerung bei 4°C brachte eine geringfügige Verbesserung. Nach einem halben Jahr konnte ein Verlust der cfu / g etwa um einen Faktor 10 beobachtet werden, weitere sechs Monate später war die Lebendzellzahl in der Formulierung bereits um einen Faktor 100 reduziert. Nach eineinhalb Jahren wurden in dem Trockenprodukt keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen. Die Ergebnisse bestätigten die erwartete Stabilität des Sporenproduktes von *B. amyloliquefaciens* FZB42. Unter den getesteten Lagerungstemperaturen war die Lebendzellzahl in der Sporenformulierung über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Neben der Reduzierung der Lebendzellzahlen von *E. tasmaniensis* DS08 konnte auch eine optische Veränderung des Trockenproduktes beobachtet werden. Abbildung 15 zeigt den Vergleich des Trockenproduktes von *E. tasmaniensis* DS08 nach zweijähriger Lagerung bei RT, 4°C und -20°C. Besonders der Ansatz, der bei RT gelagert wurde, zeigte eine deutliche Verfärbung des Pulvers von weiß zu orange. Auch die Konsistenz änderte sich von fein pulverig zu hart und klumpig. Das Trockenprodukt, das bei 4°C gelagert wurde, zeigte im Verlauf eine ähnliche Veränderung, wenngleich diese zeitlich verzögert einsetzte.



Abbildung 15: Veränderung des Trockenproduktes von *E. tasmaniensis* DS08 nach zwei Jahren Lagerung unter verschiedenen Bedingungen. Eine Et DS08 Präparation der ABiTEP GmbH wurde aliquotiert und bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Gezeigt ist die Formulierung nach zwei Jahren Lagerung bei RT (A), + 4°C (B) und -20°C (C).

3.3 Einsatz formulierter Toxine

Neben der Formulierung der Antagonisten wurden auch Toxine als Trockenformulierung getestet. Dies sollte Aufschluss über die Einsatzfähigkeit von Toxinen, die eine hemmende Wirkung auf *E. amylovora* gezeigt haben, in einer für die Praxis anwendbaren Form geben.

3.3.1 Hemmwirkung formulierter Toxine im Agar-Diffusionstest

Mittels des in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Agar-Diffusionstestes, lassen sich qualitativ Hemmwirkungen von Hemmstoffen bestimmen. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse eines Agar-Diffusionstestes mit Toxinen aus getrockneten Kulturüberständen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1. Auf den Bereichen der Platte, auf denen

3. Ergebnisse

die Toxine getropft wurden, war das Wachstum von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux vollständig gehemmt. Zwischen den Toxinen von *P. polymyxa* M1 (1) und *B. amyloliquefaciens* FZB42 (2, 3) war auf der Platte kein Unterschied zu erkennen. Der Durchmesser der Hemmhöfe betrug bei den drei getesteten Varianten jeweils ca. 1,2 cm.

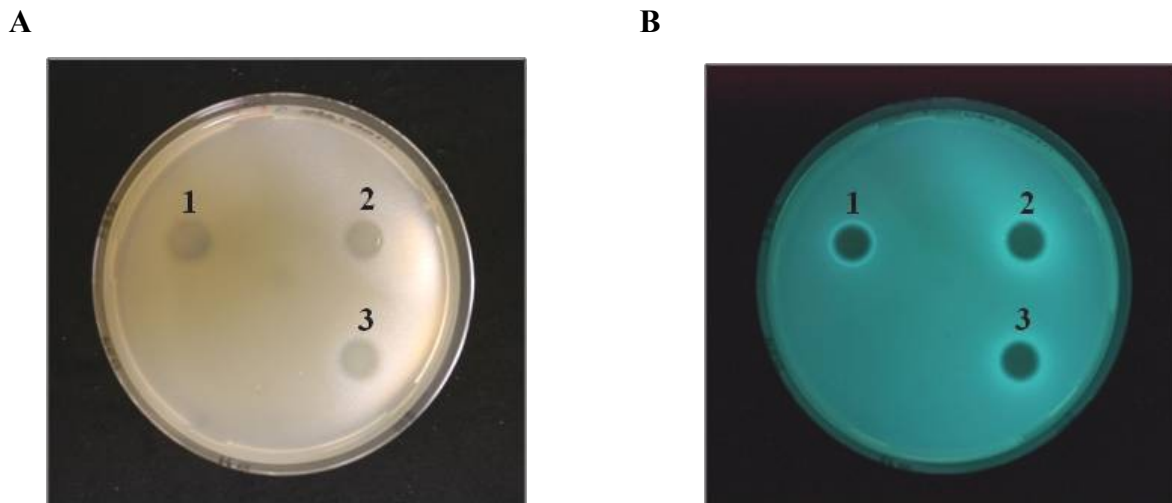


Abbildung 16: Hemmwirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 Toxinen auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux im Agar-Diffusionstest. 0,3% Agar wurde mit 1×10^7 cfu / ml Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux versetzt und auf LB Platten gegossen. Von den von ABiTEP zur Verfügung gestellten Toxine wurden 0,1 g / ml konzentrierte Lösungen in H_2O angesetzt und in 5 μ l Tropfen auf die Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux Platten gegeben und über Nacht bei 28°C inkubiert. Pp M1 (1) und Ba FZB42 Toxine (2,3). A: Wachstumshemmung von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux auf LB Platten. B: Ansicht der Platte nach einer Belichtungszeit von 60 sec zur Aufnahme der Lumineszenz von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux.

3.3.2 Wirkung der formulierten Toxine auf *E. amylovora* in Flüssigkultur

Um die Effektivität der trockenformulierten Toxine genauer zu untersuchen, wurde ein Hemmtest mit *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.4). Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Trockenprodukte getestet, um mögliche Unterschiede in der Wirksamkeit der Toxine von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 zu detektieren.

Abbildung 17 zeigt einen Hemmtest mit *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bei einer Konzentration der Toxine von 25 μ g / ml. Obwohl in dem in Abschnitt 3.3.1 dargestellten Agar-Diffusionstest kein Unterschied zwischen den Toxinen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 ersichtlich war, zeigten die formulierten Toxine von *P. polymyxa* M1 im Hemmtest eine bessere Wirkung auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux als die Toxine von *B. amyloliquefaciens* FZB42.

3. Ergebnisse

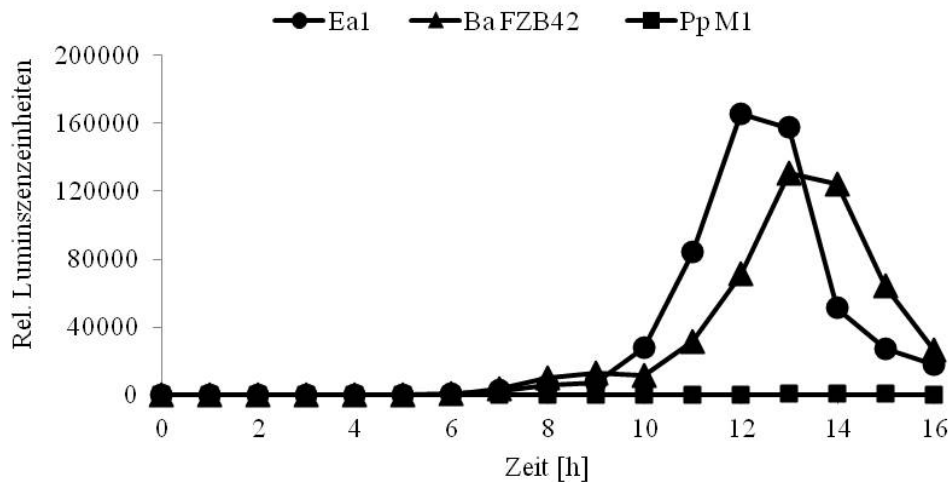


Abbildung 17: Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch trockenformulierte Toxine (25 µg / ml) von *B. amyloliquefaciens* FZB42 bzw. *P. polymyxa* M1 in Flüssigkultur. Die von ABiTEP zur Verfügung gestellten Toxine wurden in Konzentrationen von 0,2 g / ml und 0,001 g / ml in H₂O aufgenommen. In einer Mikrotiterplatte wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in LB + Km angelegt, um Konzentrationen von 400 µg / ml bis 6,25 µg / ml zu testen. Eine frische Übernachtskultur von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux wurde verwendet, um eine Kultur mit einer Startdichte von 1×10^6 cfu / ml anzupflanzen. Das Gesamtvolumen von 200 µl wurde bei 200 rpm und 28°C inkubiert und über einen Zeitraum von 16 h im Platerader die relative Lumineszenz gemessen. Die Grafik zeigt die Lumineszenz von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux bei der Kultivierung mit 25 µg / ml Ba FZB42 (Dreieck) bzw. Pp M1 (Quadrat) Toxinen. Als Kontrolle wurde eine unbehandelte Kontrolle von Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux (Kreis) verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt zwei unabhängigen Wiederholungen mit gleicher Tendenz.

Die unbehandelte Kontrolle zeigte nach 12 h Inkubation eine rel. Lumineszenz von ca. 160000 Einheiten. Bei einer Konzentration von 25 µg / ml war die Wirkung des *B. amyloliquefaciens* FZB42 Trockenproduktes fast vollständig aufgehoben, die maximal gemessene rel. Lumineszenz von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux lag bei ca. 120000 rel. Lumineszenzeinheiten zum Zeitpunkt $t = 13$ h. Dies entsprach einem Anteil von etwa 80% der unbehandelten Kontrolle. Die Zugabe der Toxine von *P. polymyxa* M1 bewirkte hingegen bei der Konzentration von 25 µg / ml eine 100%ige Hemmung des Reporterstammes *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux.

3. Ergebnisse

3.4 Blütenversuche

Zur Überprüfung der antagonistischen Wirkung auf der Blüte, der primären Eintrittspforte des Feuerbranderreger, wurden die Produktmuster in einem Apfelblütenassay getestet.

3.4.1 Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf *E. amylovora* auf der Apfelblüte

Apfelblüten aus dem Gewächshaus wurden, wie in Kapitel 2.8.1.2 beschrieben, mit dem Antagonisten behandelt und mit *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux infiziert. Abbildung 18 zeigt den Vergleich einer gesunden Apfelblüte in Abbildung 18A (nicht-infizierte Negativkontrolle) mit einer symptomatischen Blüte in Abbildung 18B (infizierte Blüte aus der Positivkontrolle) nach fünf Tagen Inkubation unter Laborbedingungen. Die charakteristische Verbräunung des Blütenbodens ist deutlich zu erkennen.

A



B



Abbildung 18: Kontrollen im Apfelblütenassay. A: Gesunde Apfelblüte. B: Symptomatische Apfelblüte; inokuliert mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtskultur.

Abbildung 19 zeigt Blüten, die mit *E. tasmaniensis* DS08 behandelt wurden. Die Applikation des Antagonisten hatte keinen phytotoxischen Effekt auf die Blüte (Abbildung 19A). Die Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux im Blütenassay ist in Abbildung 19B zu sehen. Der Ausschnitt zeigt einige mit *E. tasmaniensis* DS08 behandelte Apfelblüten fünf Tage nach der Infektion mit *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux. Der Großteil der Blüten blieb symptomfrei, vereinzelt waren jedoch Blüten zu erkennen, deren Blütenboden eine Verbräunung zeigte. Insgesamt lag der Wirkungsgrad bei den mit *E. tasmaniensis* DS08 behandelten Blüten unter Laborbedingungen zwischen 53% und 82% (siehe Tabelle 19).

3. Ergebnisse

A



B



Abbildung 19: Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 gegen *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux auf Apfelblüten. Die Inkubation der Blüten erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Gezeigt sind die Blüten nach fünf Tagen Inkubation. A: Blüten behandelt mit 10^8 cfu / ml Et DS08 aus der von der ABiTEP GmbH zur Verfügung gestellten Trockenformulierung. B: Apfelblüten behandelt mit 10^8 cfu / ml Et DS08 aus der Trockenformulierung + Inokulation mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtskultur.

Auch die Wirkung des Gram-negativen Antagonisten *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurde auf der Blüte untersucht. Eingesetzt wurde dabei die Sporenformulierung von der ABiTEP GmbH. Ein phytotoxischer Effekt war bei der Behandlung mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 nicht zu beobachten. Die Wirkungsgrade schwankten zwischen 15% bis 58% (Tabelle 18). Die Zellen von *P. polymyxa* M1 zeigten auf der Blüte keine Wirkung (nicht gezeigt).

Tabelle 19: Wirkungsgrad der formulierten Antagonisten *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux im Apfelblütenassay.

| Behandlung | Konzentration | WG [%] |
|-----------------|--------------------------|----------------|
| Et DS08 | 1×10^8 cfu / ml | 53, 56, 64, 82 |
| Ba FZB42 Sporen | 1×10^8 cfu / ml | 15, 31, 58 |

3. Ergebnisse

3.4.2 Wirkung von Toxinen auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux im Blütenassay

In den Vorversuchen zeigten besonders die trockenformulierten Kulturüberstände der Toxine von *P. polymyxa* M1 im Hemmtest eine sehr gute Wirkung auf den Feuerbranderreger und zwar auch bei niedrigen Konzentrationen (siehe Abschnitt 3.3.2). Abbildung 20 zeigt den Ausschnitt eines Blütenassays bei dem eine Behandlung mit formulierten Toxinen von *P. polymyxa* M1 mit einer Konzentration von 50 µg / µl erfolgte.



Abbildung 20: Wirkung von *P. polymyxa* M1 Toxinen gegen *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux auf Apfelblüten. Die Blüten wurden mit 0,05 mg / µl Pp M1 Toxinen aus der Trockenformulierung behandelt. Die Inokulation erfolgte mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtkultur. Die Inkubation der Blüten erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Gezeigt sind die Blüten nach fünf Tagen Inkubation.

Der Wirkungsgrad der getesteten Toxine von *P. polymyxa* M1 lag im Blütenassay zwischen 5% und 33%. Die Behandlung mit Toxinen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 erreichte lediglich einen maximalen Wirkungsgrad von 16% (Tabelle 20).

Tabelle 20: Überblick über die Wirkungsgrade der formulierten Toxine im Blütenassay.

| Behandlung | Konzentration | WG [%] |
|--------------------------------|--|---------------|
| Ba FZB42 Toxine | 1 mg / ml | 11, 16 |
| Pp M1 Toxine | 1 mg / ml | 5, 33 |
| Ba FZB42 Sporen + Pp M1 Toxine | 1x10 ⁸ cfu / ml + 1 mg / ml | 84, 89 |

Eine Verbesserung der Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 ließ sich durch eine Kombination der Toxine von *P. polymyxa* M1 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen erzielen. Eine mögliche Wirkung der *P. polymyxa* M1 Toxine auf *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurde im Vorfeld von der ABiTEP GmbH untersucht. Es konnte kein Hemmeffekt auf *B. amyloliquefaciens* FZB42 festgestellt werden. Abbildung 21 zeigt den Ausschnitt eines Blütenassays bei dem die Behandlung mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen in Kombination mit *P. polymyxa* M1 Toxinen erfolgte.

3. Ergebnisse

Der Anteil an symptomatischen Blüten war deutlich reduziert. Der Wirkungsgrad dieser Behandlungsvariante lag bei 84% bis 89% und war damit deutlich besser als die Einzelapplikation von *B. amyloliquefaciens* FZB42 mit maximal 58% Wirkungsgrad bzw. der *P. polymyxa* M1 Toxine mit maximal 33% Wirkungsgrad (siehe Tabelle 19 und 20).



Abbildung 21: Wirkung von *P. polymyxa* M1 Toxinen in Kombination mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen gegen *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux auf Apfelblüten. Die Blüten wurden mit 10^8 cfu / ml Ba FZB42 und $0,05$ mg / μ l Pp M1 Toxinen aus den Trockenformulierungen behandelt und anschließend mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtskultur inokuliert. Die Inkubation der Blüten erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Gezeigt sind die Blüten nach fünf Tagen Inkubation.

3.4.3 Entwicklung von *E. tasmaniensis* DS08 und *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux auf der Blüte

Neben der Hemmwirkung wurde auch die Entwicklung von Antagonist und Pathogen auf der Apfelblüte untersucht. Dazu wurde wie in Kapitel 2.8.1.2 beschrieben die cfu pro Blüte bestimmt. Abbildung 22 zeigt die Entwicklung von *E. tasmaniensis* DS08 nach der Behandlung der Blüte über einen Zeitraum von einer Woche.

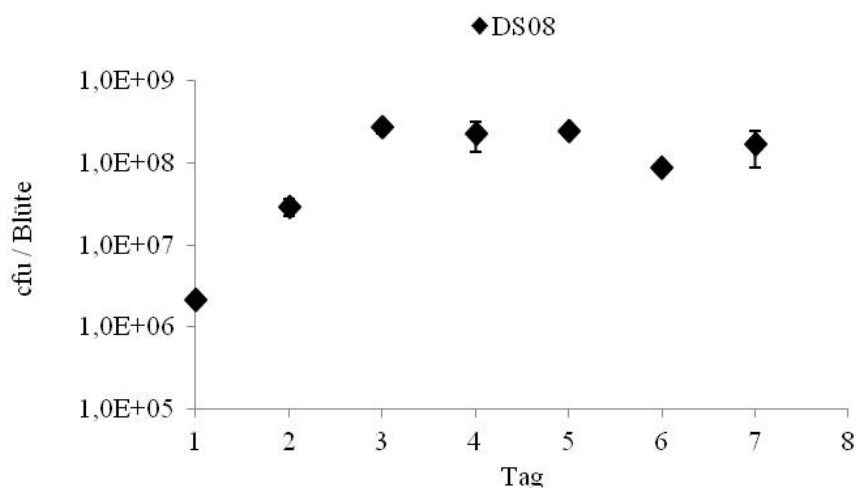


Abbildung 22: Entwicklung von *E. tasmaniensis* DS08 nach Applikation auf der Apfelblüte. Die Apfelblüten wurden mit 1×10^8 cfu / ml Et DS08 aus der Trockenformulierung gleichmäßig besprüht und bei feuchten Bedingungen bei RT inkubiert. Täglich wurden drei Einzelblüten gewaschen und eine Verdünnungsreihe der Waschprobe auf St. I Platten plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuches von drei unabhängigen Wiederholungen über einen Versuchszeitraum von einer Woche.

3. Ergebnisse

Wie in der Grafik zu erkennen ist, lag die Startdichte an Tag 1 bei ca. 2×10^6 cfu / Blüte. Der kritische Zeitraum für die Etablierung des Antagonisten unter den getesteten Bedingungen lag in den ersten drei Tagen. Am dritten Tag wurde eine Zellzahl von ca. 3×10^8 cfu / Blüte erreicht. In allen Versuchen lag die maximale Zelldichte von *E. tasmaniensis* DS08 zwischen 1×10^8 cfu / Blüte und 1×10^9 cfu / Blüte.

Parallel dazu wurde auch die Entwicklung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux untersucht (Abbildung 23). Um das Pathogen selektiv nachweisen zu können, wurde ein Kanamycin-resistenter Stamm eingesetzt.

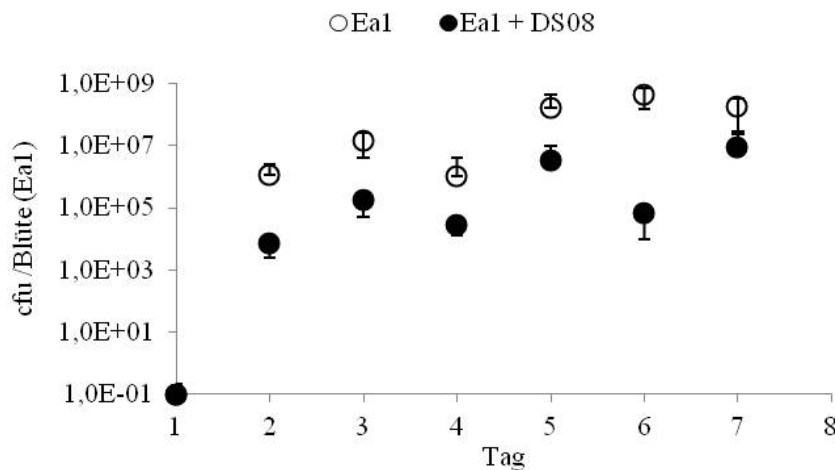


Abbildung 23: Entwicklung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux auf der Apfelblüte nach der Behandlung mit *E. tasmaniensis* DS08. Die Apfelblüten wurden mit 1×10^8 cfu / ml Et DS08 aus der Trockenformulierung gleichmäßig besprüht und mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtskultur inokuliert (gefüllt). Die Inkubation erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Täglich wurden drei Einzelblüten gewaschen und eine Verdünnungsreihe der Waschprobe auf St. I + Km Platten plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Apfelblüten mit 500 cfu Ea 1/79 pfdC1-Z'-lux aus einer frischen Übernachtskultur inokuliert (leer). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuches mit drei Blüten pro Zeitpunkt über einen Versuchszeitraum von einer Woche.

Trotz eines Inokulums von 500 cfu / Blüte erreichte *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux bereits am zweiten Tag sehr hohe Zelldichten von 1×10^6 (Ea1) bzw. 1×10^4 (Ea1 + DS08) cfu / Blüte. Am fünften Tag wurde das Maximum mit knapp unter 1×10^9 cfu / Blüte erreicht. Der Vergleich beider Ansätze zeigte, dass bei den mit *E. tasmaniensis* DS08 behandelten Blüten die Zelldichten des Pathogens um ein bis zwei Zehnerpotenzen geringer waren.

3.4.4 Entwicklung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Apfelblüte

E. tasmaniensis ist in der Lage, die Blüte bis zu einer Zelldichte bis ca. 1×10^9 cfu / Blüte zu besiedeln (siehe Abbildung 22). Auch die Entwicklung des Bodenbakteriums *B. amyloliquefaciens* FZB42 nach Applikation auf der Blüte wurde überprüft.

3. Ergebnisse

In Abbildung 24 ist die Entwicklung von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 im Vergleich dargestellt.

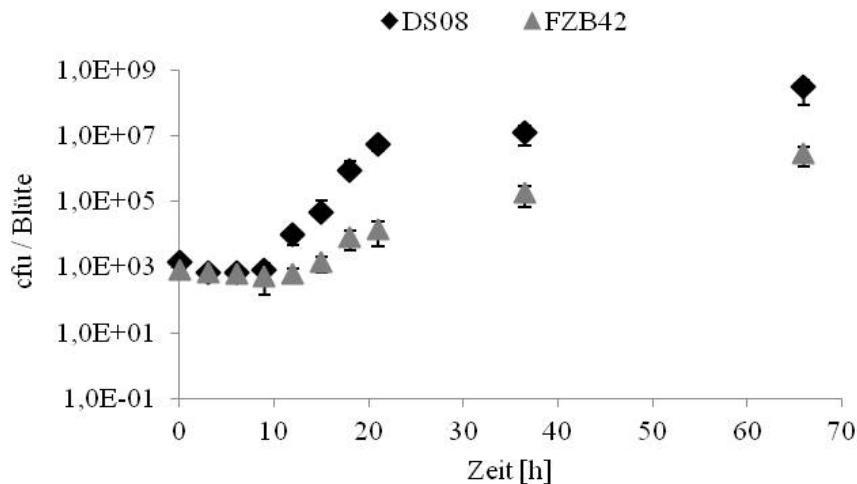


Abbildung 24: Vergleich der Entwicklung von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf Apfelblüten. Die Blüten wurden mit 1×10^5 cfu / ml trockenformulierten Et DS08 (Raute) bzw. Ba FZB42 (Dreieck) gleichmäßig besprüht und unter feuchten Bedingungen bei RT inkubiert. Über einen Zeitraum von 70 h wurden jeweils zehn Einzelblüten gewaschen und verschiedene Verdünnungsstufen auf St. I Medium plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuchs aus drei unabhängigen Wiederholungen.

Beide Antagonisten traten nach ca. 12 h Inkubation in die exponentielle Wachstumsphase ein, wobei *E. tasmaniensis* DS08 einen stärkeren Anstieg aufwies. Ein wesentlicher Unterschied zeigte sich bei der maximalen Zelldichte, die die Antagonisten auf der Blüte erreichen: Während *E. tasmaniensis* DS08 eine Zelldichte um ca. 1×10^9 cfu / Blüte erreichte, lag die cfu / Blüte von *B. amyloliquefaciens* FZB42 bei ca. 2×10^6 und damit zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger.

In einem anderen Versuchsansatz wurde der Anteil von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen mit der Gesamtzellzahl von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte bestimmt (siehe Kapitel 2.8.1.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Nach der Applikation von *B. amyloliquefaciens* FZB42 lag der Großteil der Zellen, wie erwartet, in Sporenform vor. Nach 12 h Inkubation nahm der Anteil vegetativer Zellen langsam zu und erreichte unter den getesteten Bedingungen den höchsten Wert nach 24 h. Nur noch ca. 20% der Zellen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 lagen zu diesem Zeitpunkt als Sporen vor. Bereits 36 h nach der Applikation nahm der Sporenanteil wieder zu und 60 h nach Applikation waren kaum noch vegetative Zellen vorhanden.

3. Ergebnisse

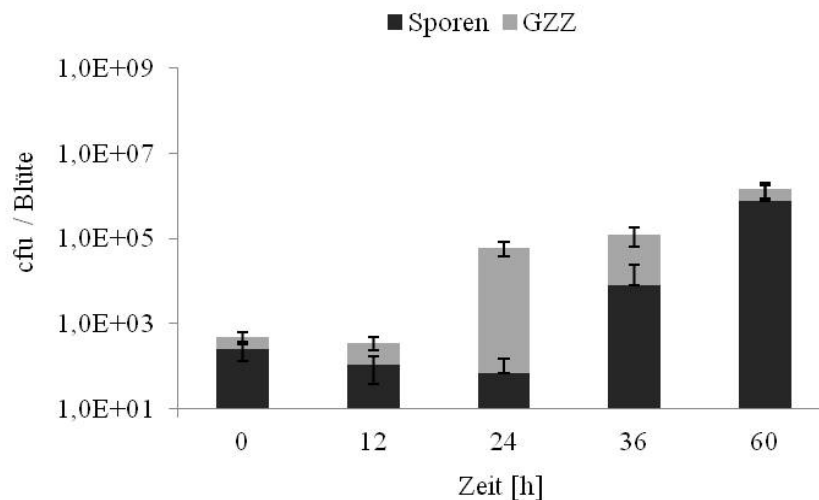


Abbildung 25: Verhältnis der *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen zur Gesamtzellzahl (GZZ) nach Applikation auf Apfelblüten. Die Apfelblüten wurden mit 1×10^5 cfu / ml Ba FZB42 Sporen gleichmäßig besprüht und unter feuchten Bedingungen bei RT inkubiert. Über einen Zeitraum von 60 h wurden jeweils zehn Einzelblüten gewaschen, die Waschprobe aliquotiert und ein Aliquot bei 80°C erhitzt. Von der hitzebehandelten und der unbehandelten Waschprobe wurden verschiedene Verdünnungen angelegt und auf St. I Medium plattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 28°C wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Gezeigt ist der Anteil an Sporen (schwarz) zur Gesamtzellzahl (grau). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuchs von drei unabhängigen Wiederholungen.

3.5 Additive zur Wachstumsförderung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte

Um die Zelldichte von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte zu erhöhen, wurden verschiedene Nährstoffzusätze, wie z. B. die Zugabe von Stärke getestet. *B. amyloliquefaciens* FZB42 ist über das Enzym α -Amylase in der Lage, dieses Polysaccharid zu spalten (Takkinen et al. 1983). *E. amylovora* hingegen kann Stärke nicht hydrolysieren (Martinec & Kocur 1964). Um dies zu bestätigen, wurden *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *E. amylovora* 1/79 auf einer mit 0,5% Stärke versetzten Agarplatte ausgestrichen und der Stärkeabbau untersucht (siehe Kapitel 2.5.7). Auf dem Bereich der Platte auf der *E. amylovora* ausgestrichen wurde, war im gesamten Wachstumsbereich des Pathogens Stärke nachweisbar (Abbildung 26A). Im Gegensatz dazu konnte in dem Bereich auf dem *B. amyloliquefaciens* FZB42 ausgestrichen wurde, keine Färbung beobachtet werden (Abbildung 26B). Dies bestätigte den Abbau des Polysaccharids durch den Antagonisten *B. amyloliquefaciens* FZB42.

3. Ergebnisse

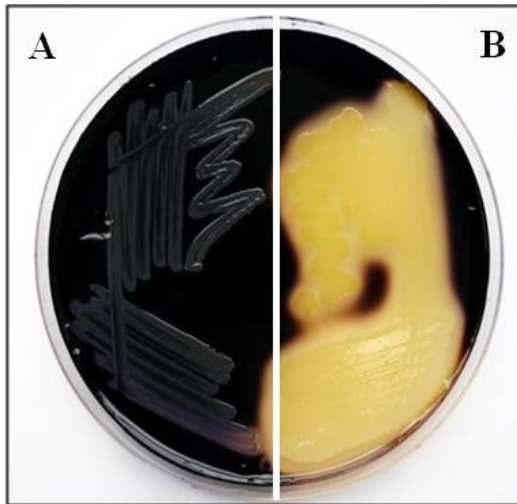


Abbildung 26: Verwertung von Stärke durch *B. amyloliquefaciens* FZB42. Auf einer LB Agarplatte mit 0,5% Stärke wurden Ea 1/79 (A) und Ba FZB42 (B) über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit 0,5% Iod-Kaliumiodidlösung (1:2) überschichtet. Helle Bereiche zeigen den Abbau von Stärke.

Die Entwicklung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 unter Stärkezugabe wurde anschließend auch auf der Blüte untersucht (Abbildung 27).

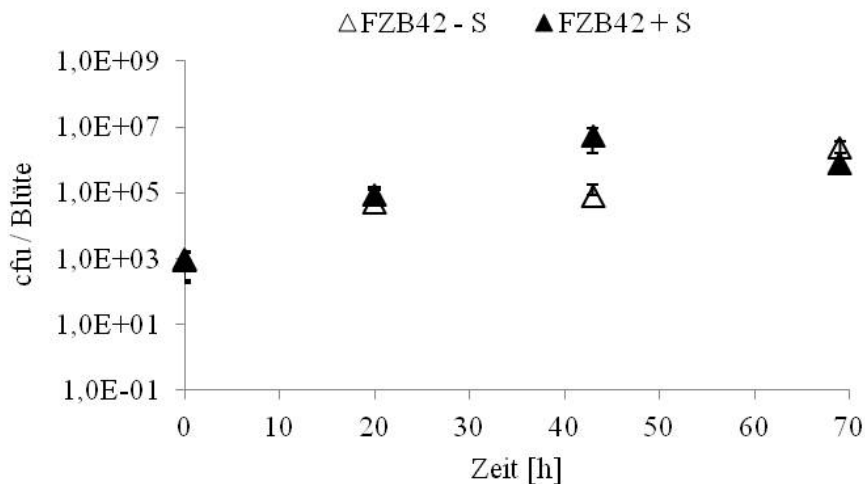


Abbildung 27: Entwicklung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Apfelblüte bei der Applikation mit (+S) bzw. ohne (-S) Stärke. Auf der Blüte wurden 10^5 cfu / ml Ba FZB42 und 0,5% Stärkelösung appliziert (gefüllt). Die Inkubation erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Täglich wurden zehn Einzelblüten gewaschen und eine Verdünnungsreihe der Waschprobe auf LB Platten plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Als Kontrolle wurden Apfelblüten mit 1×10^5 cfu / ml Ba FZB42 ohne Stärkezusatz inokuliert (leer). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuches von zwei unabhängigen Wiederholungen über einen Versuchszeitraum von 70 h.

Die Blüten wurden mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 mit (FZB42+S) und ohne (FZB42-S) 0,5% Stärkezusatz behandelt und die cfu / Blüte über einen Zeitverlauf von insgesamt 70 h bestimmt. Nach der Applikation von 1×10^5 cfu / ml Sporenformulierung lagen zum Zeitpunkt $t = 0$ h etwa 1×10^3 cfu / Blüte vor.

3. Ergebnisse

Die Entwicklung der cfu von *B. amyloliquefaciens* FZB42 verlief zwischen beiden Behandlungsvarianten ähnlich. 20 h nach der Behandlung lag die Zelldichte bei beiden Varianten bei ca. 7×10^4 . Bei $t = 42$ h lag die cfu / Blüte bei der Variante mit Stärkezusatz leicht höher (5×10^6 cfu / Blüte) als bei der Variante ohne Stärke (8×10^4 cfu / Blüte). Die cfu lagen zum letzten Probenzeitpunkt ($t = 70$ h) jedoch in beiden Behandlungsvarianten bei ca. 1×10^5 cfu / Blüte. Der Vergleich zeigte, dass unter den getesteten Bedingungen nur ein minimaler Unterschied bei der Entwicklung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte zwischen den beiden Behandlungsvarianten vorlag.

In einem weiteren Versuch wurde der Nährstoffzusatz B2 (ABiTEP GmbH) getestet. Abbildung 28 zeigt die Entwicklung der Zellzahlen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte bei Behandlung mit und ohne Additiv B2.

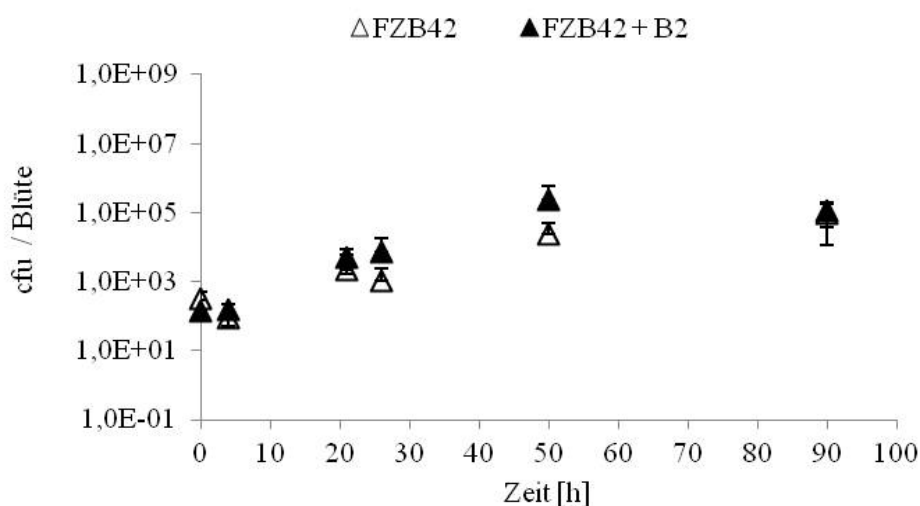


Abbildung 28: Entwicklung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Apfelblüte bei Zusatz Additiv B2. 1×10^5 cfu / ml Ba FZB42 und 0,1% Additiv B2 wurden auf die Blüten appliziert (voll). Die Inkubation erfolgte unter feuchten Bedingungen bei RT. Täglich wurden fünf Einzelblüten gewaschen und eine Verdünnungsreihe der Waschprobe auf LB Platten plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blüte bestimmt. Als Kontrolle wurden Apfelblüten mit 10^5 cfu / ml Ba FZB42 ohne Nährstoffzusatz besprüht (leer). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuches von zwei unabhängigen Wiederholungen über einen Versuchszeitraum von 90 h.

Auch in der Behandlungsvariante mit Additiv konnte unter Laborbedingungen nur ein minimaler Unterschied zur Kontrolle ohne Additiv festgestellt werden. Die Startdichte lag in beiden Varianten bei ca. 2×10^2 cfu / ml. Nach 20 h konnte ein Anstieg der Zelldichte pro Blüte beobachtet werden. 50 h nach der Applikation des Antagonisten lag die cfu / Blüte in dem Ansatz mit Additiv B2 bei ca. 2×10^5 . Die Zellen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 ohne den Nährstoffzusatz erreichten $2,5 \times 10^4$ cfu / Blüte und lagen damit ca. eine Zehnerpotenz niedriger als in der Variante mit dem Additiv B2. Zum letzten Probenzeitpunkt nach 90 h lag bei beiden Behandlungsvarianten die cfu / Blüte bei ca. 1×10^5 .

3. Ergebnisse

3.6 Freilandversuche

Um die Hemmwirkung der Antagonisten *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 gegen den Feuerbranderreger unter Praxisbedingungen zu untersuchen, wurde in den Jahren 2013, 2014 und 2015 auf der Versuchsanlage in Mannheim / Kirschgartshausen je ein Freilandversuch durchgeführt (siehe Kapitel 2.9.1). Abbildung 29 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

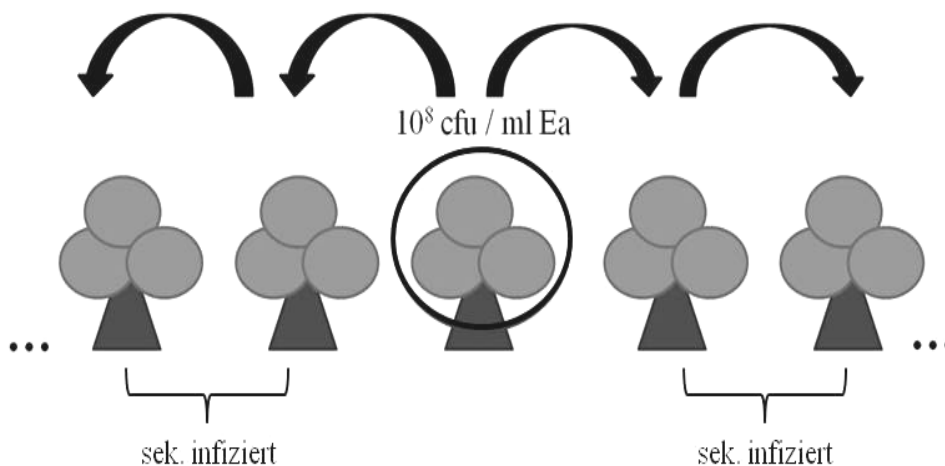


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Parzellenbehandlung im Feuerbrandbekämpfungsversuch. Die Blüten der Bäume wurden mit dem jeweils zu testenden Ansatz gleichmäßig besprüht. Anschließend wurde der mittlere Baum jeder Parzelle mit einer Zelldichte von 1×10^8 cfu / ml mit *E. amylovora* infiziert (Kreis = primär infiziert). Über natürliche Vektoren erfolgte die Ausbreitung des Erregers auf die benachbarten Bäume, die auf diese Weise sekundär infiziert wurden.

In jeder Parzelle wurde der mittlere Baum mit einer Dichte von 1×10^8 cfu / ml mit dem Pathogen primär infiziert, um in der Anlage einen Infektionsdruck zu erzeugen. Die Infektion der benachbarten Bäume erfolgte über die natürliche Ausbreitung innerhalb der Versuchsanlage über Vektoren (sekundär infiziert).

3.6.1. Witterungsverhältnisse und Befall

Die vorherrschenden Witterungsverhältnisse zur Blütezeit sind ein entscheidender Faktor beim Auftreten von Feuerbrandinfektionen. Abbildung 30 zeigt eine Übersicht über den Witterungsverlauf während der drei Freilandversuche in den Jahren 2013 (A), 2014 (B) und 2015 (C). Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, begünstigen nach dem Prognosemodell Maryblyt™ eine Tagesdurchschnittstemperatur von $\geq 15,6^\circ\text{C}$ und Niederschlagsmengen von $\geq 0,25$ mm oder $\geq 2,5$ mm Niederschlag am Vortag die Infektion mit *E. amylovora* (Moltmann 2004).

3. Ergebnisse

A

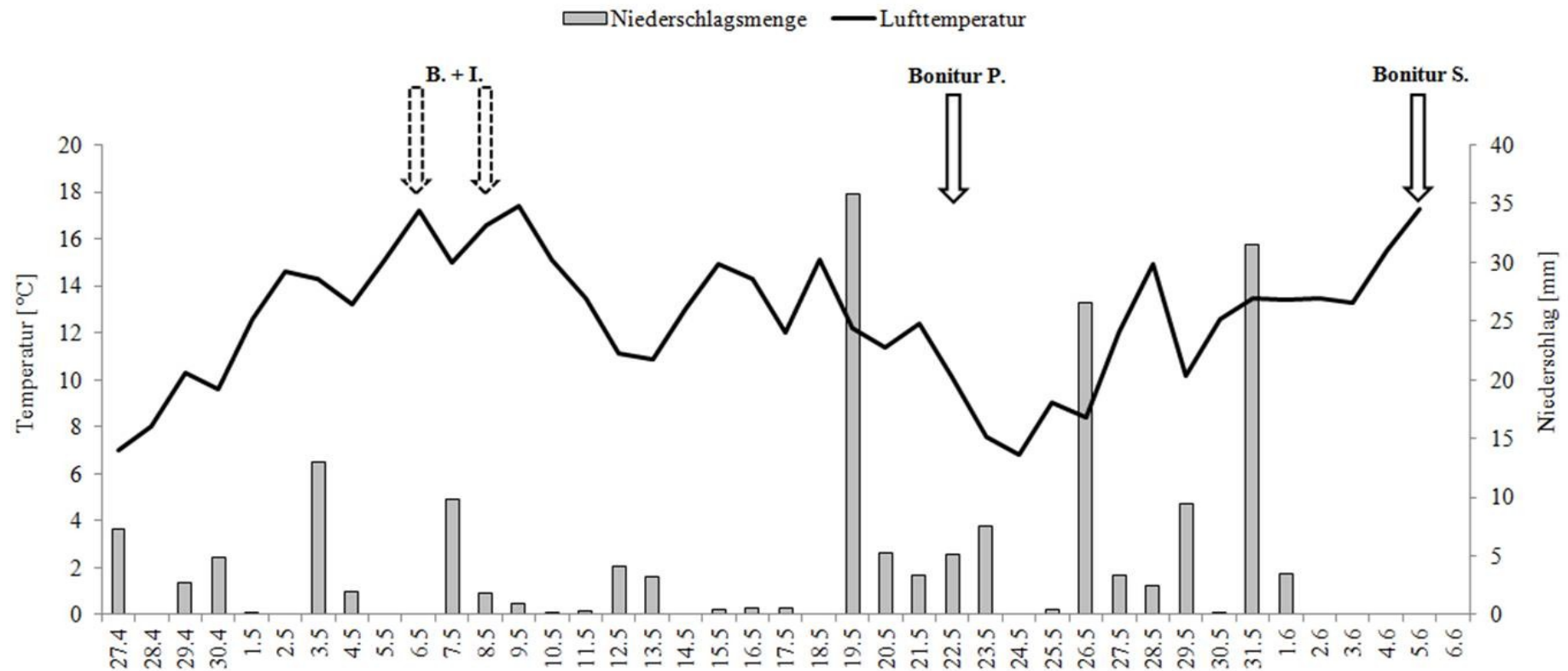
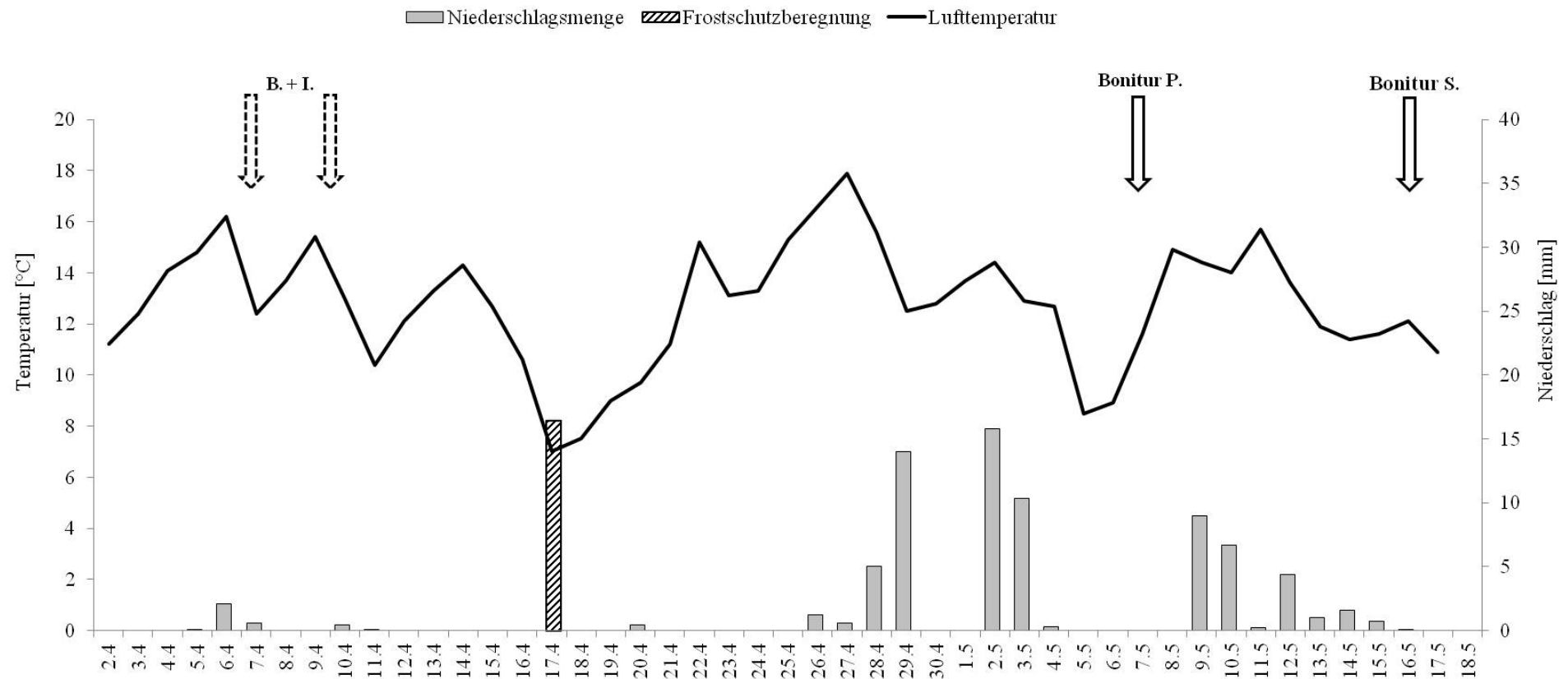


Abbildung 30A: Witterungsverlauf während des Feuerbrandbekämpfungsversuches 2013. Gezeigt ist die Tagesdurchschnittstemperatur in Grad Celsius sowie die Niederschlagsmengen in mm (1 mm \cong 1 l pro m²). Die Termine für die Behandlung (B.) und künstliche Infektion (I.) sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt. Die Zeitpunkte der Bonitur der primär infizierten Bäume (Bonitur P.) bzw. der sekundär infizierten Bäume (Bonitur S.) sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert.

Daten: Deutscher Wetterdienst, Station Mannheim

3. Ergebnisse

B

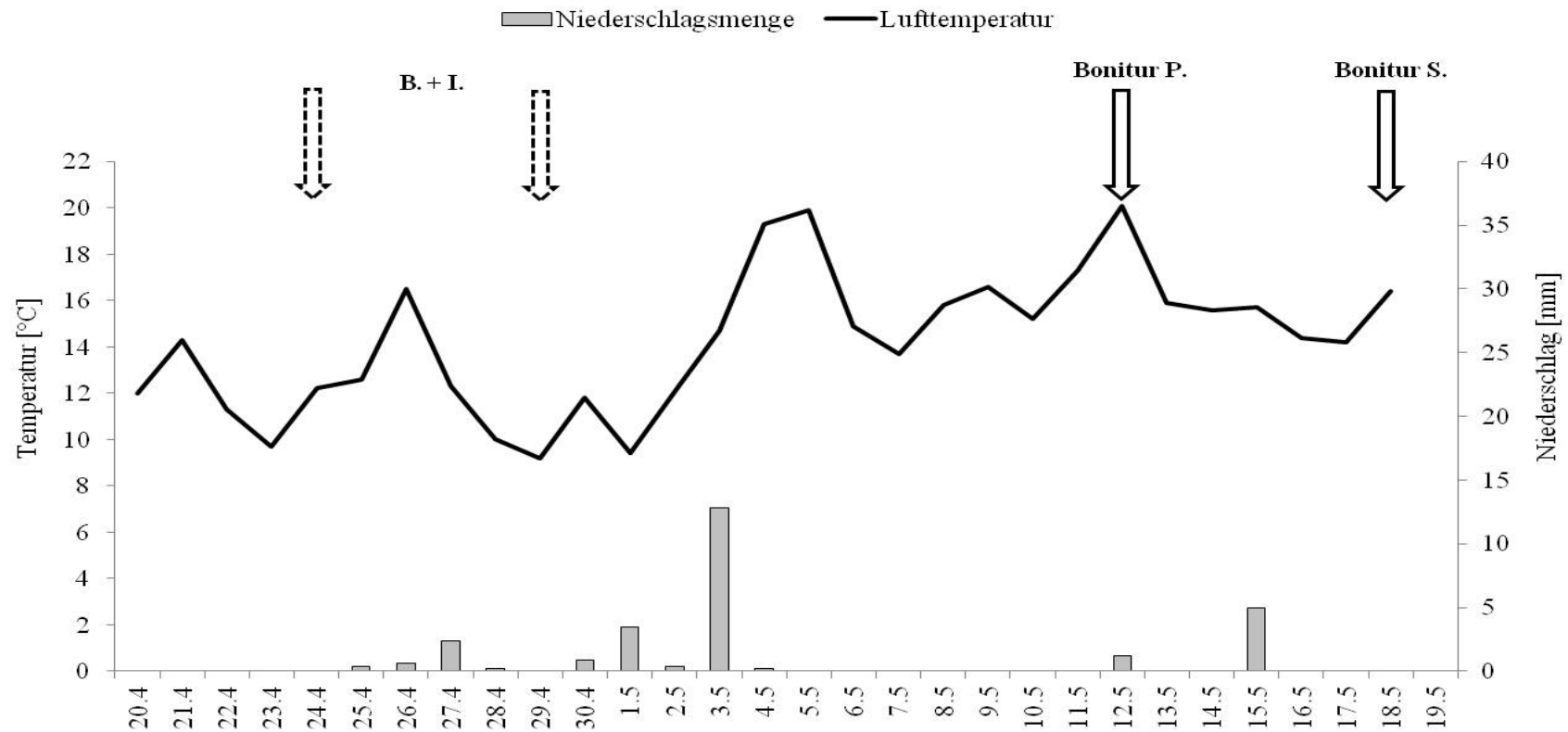


30B: Witterungsverlauf während des Feuerbrandbekämpfungsversuches 2014. Gezeigt ist die Tagesdurchschnittstemperatur in Grad Celsius sowie die Niederschlagsmengen in mm ($1 \text{ mm} \hat{=} 1 \text{ l pro m}^2$). Die Termine für die Behandlung (B.) und künstliche Infektion (I.) sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt. Die Zeitpunkte der Bonitur der primär infizierten Bäume (Bonitur P.) bzw. der sekundär infizierten Bäume (Bonitur S.) sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert.

Daten: Wetterstation Versuchsanlage Kirschgartshausen.

3. Ergebnisse

C



30C: Witterungsverlauf während des Feuerbrandbekämpfungsversuches 2015. Gezeigt ist die Tagesdurchschnittstemperatur in Grad Celsius sowie die Niederschlagsmengen in mm (1 mm \cong 1 l pro m²). Die Termine für die Behandlung (B.) und künstliche Infektion (I.) sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt. Die Zeitpunkte der Bonitur der primär infizierten Bäume (Bonitur P.) bzw. der sekundär infizierten Bäume (Bonitur S.) sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert.

Daten: Wetterstation Versuchsanlage Kirschgartshausen.

3. Ergebnisse

2013 begann die Blüte der Apfelbäume Anfang Mai. Die Behandlung und Infektion wurde am 06.05.2013 und am 08.05.2013 durchgeführt. Die Grafik 30A zeigt, dass zwischen den beiden Behandlungsterminen Tagesdurchschnittstemperaturen von 14°C bis 17°C vorlagen. Bis zur Bonitur der primär infizierten Bäume am 23.05.2013 erreichte die Tagesdurchschnittstemperatur Werte von mindestens 8°C bis maximal 17°C. Während des Versuchszeitraumes konnten vereinzelt Niederschläge mit bis zu 35 mm gemessen werden (19.05.2013). Sowohl die Temperaturen (6°C bis 17°C) als auch die Niederschlagsereignisse nahmen zwischen der Bonitur der primär infizierten sowie der sekundär infizierten Bäume zu. Am 06.05.2013 (17,2°C), 08.05.2013 (16,6°C) und 09.05.2013 (17,4°C) wurden Tagesdurchschnittstemperaturen von $\geq 15,6^\circ\text{C}$ erreicht. Diese warmen Tage nach der Infektion boten gute Wachstumsbedingungen für *E. amylovora*. Am 07.5.2013 konnte außerdem mit 9,8 mm ein hoher Niederschlag von $\geq 0,25$ mm gemessen werden, wodurch die Infektionsbedingungen ebenfalls begünstigt wurden.

Im Jahr 2014 begann die Apfelblüte bereits Anfang April. Der Witterungsverlauf während des Freilandversuches 2014 ist in Abbildung 30B gezeigt. Am 06.04.2014 lagen die Tagesdurchschnittstemperatur bei 16,2°C und die Niederschlagsmenge bei 2,1 mm. Am 07.04.2014 wurde die erste und am 10.04.2014 die zweite Behandlung und Infektion durchgeführt. In diesem Zeitraum lagen die Tagesdurchschnittstemperaturen zwischen 12,4°C und 15,4°C und damit unterhalb der kritischen Grenze von $\geq 15,6^\circ\text{C}$. Auch Niederschläge waren in diesem Zeitraum kaum vorhanden. Am 17.04.2014 sank die Temperatur so tief, dass eine Frostschutzberechnung zum Schutz der Blüten notwendig war. Danach wurde es deutlich wärmer und am 27.04.2014 wurde eine Tagesdurchschnittstemperatur von 17,9°C erreicht. In den darauffolgenden Tagen konnten außerdem hohe Niederschläge zwischen 5 mm und 15,8 mm gemessen werden.

Am 24.04.2015 war der erste Behandlungs- und Inokulationstermin für den Bekämpfungsversuch 2015. Abbildung 30C zeigt den aufgezeichneten Witterungsverlauf für dieses Versuchsjahr. Die Tagesdurchschnittstemperatur stieg nach der ersten Behandlung am 24.04.2015 bis auf 16,5°C (26.04.2015) an, fiel dann aber wieder deutlich ab. Als am 29.04.2015 die zweite Behandlung und Inokulation durchgeführt wurde, lag die Tagesdurchschnittstemperatur bei lediglich 9,2°C. Fast eine Woche nach dem zweiten Behandlungstermin stieg die Temperatur wieder an und lag mit 19,3°C (04.05.2015), 19,9°C (05.05.2015), 15,8°C (08.05.2015) und 16,6°C (09.5.2015) über dem kritischen Wert von $\geq 15,6^\circ\text{C}$.

3. Ergebnisse

Zwischen den beiden Behandlungs- und Infektionsterminen tauchten vereinzelt Niederschläge mit Mengen unter 5 mm auf. Das stärkste Niederschlagsereignis (13 mm) trat am 03.05.2015 auf.

Der Feuerbrandbefall innerhalb des Versuches wurde mittels einer unbehandelten Kontrolle bestimmt. In Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen schwankte der Befall stark zwischen den Versuchsjahren. Abbildung 31 zeigt den Vergleich der mittleren Befallsstärken der unbehandelten Kontrolle auf den primär und sekundär infizierten Bäumen.

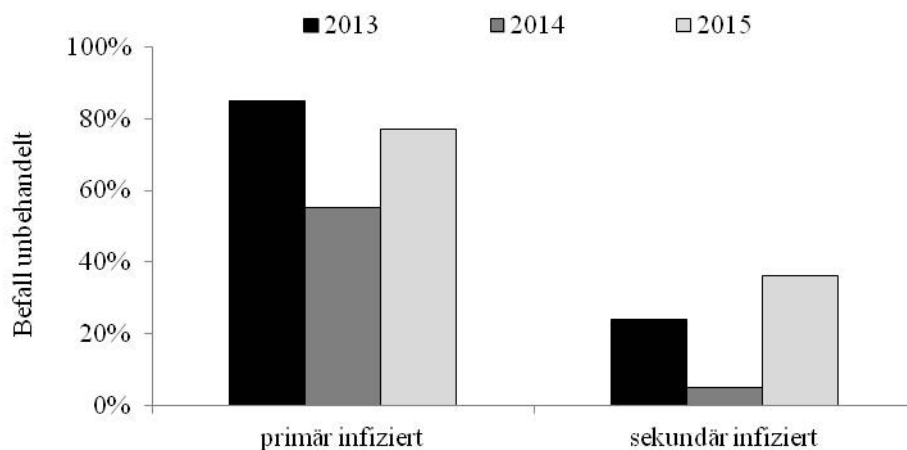


Abbildung 31: Überblick über die Befallsstärken der unbehandelten Kontrolle (Mittelwert). Befall mit *E. amylovora* auf den primär und sekundär infizierten Bäumen in der unbehandelten Kontrolle in den Versuchsjahren 2013, 2014, 2015.

Der Befall auf den primär infizierten Bäumen lag im Jahr 2013 und 2015 bei ca. 80%. Dies bestätigte die guten Bedingungen für die Entwicklung von *E. amylovora* in diesen beiden Jahren. 2014 waren die Witterungsbedingungen schlechter (Abbildung 30B). Der Befall auf den primär infizierten Bäumen lag bei ca. 50% und damit um einiges niedriger als in 2013 und 2015. Die Befallsstärken der sekundär infizierten Bäume lagen zwischen 5% (2014) und 40% (2015). Bedingt durch die Übertragung des Pathogens über natürlichen Vektoren ausgehend von den primär infizierten Bäumen, lag das Inokulum bei den sekundär infizierten Bäumen deutlich niedriger als bei den primär infizierten Bäumen. Dadurch ergeben sich insgesamt geringere Befallsstärken bei den sekundär infizierten Bäumen.

3. Ergebnisse

3.6.2 Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 im Freiland

Eine Übersicht über die getesteten Behandlungsvarianten ist in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21: Übersicht über die eingesetzten Behandlungsvarianten in den Freilandversuchen 2013, 2014 und 2015. TP = Trockenprodukt, FP = Flüssigprodukt

| Jahr | Behandlung | Formulierung | Additive* |
|-------------|-------------------|-----------------------|--|
| 2013 | Ba FZB42 | TP, Sporen | - |
| | Ba FZB42+ | TP, Sporen | Pp M1 Toxine |
| | Et DS08 | TP, vegetative Zellen | - |
| 2014 | Ba FZB42 | FP, Sporen | - |
| | Ba FZB42+ | FP, Sporen | Pp M1 Toxine, UV-Schutz, Netzmittel, Nährstoffe B2 |
| | Et DS08 | TP, vegetative Zellen | - |
| | Et DS08+ | TP, vegetative Zellen | UV-Schutz, Nährstoffe, Netzmittel |
| 2015 | Ba FZB42 | FP, Sporen | Nährstoffe B2 |
| | Ba FZB42+ | FP, Sporen | Pp M1 Toxine, UV-Schutz, Netzmittel, Nährstoffe B2 |
| | Et DS08 | TP, vegetative Zellen | - |
| | Et DS08+ | TP, vegetative Zellen | UV-Schutz, Nährstoffe |

*Die Zusammensetzung der Additive unterliegt den Firmeninterna der ABiTEP GmbH

Als Referenz für die Wirkung der Antagonisten wurde Streptomycin verwendet. Das Kaliumalaun LMA wurde als chemische Alternative zu Streptomycin eingesetzt. Tabelle 22 zeigt die Boniturergebnisse der primär infizierten Bäume. Gezeigt sind der Mittelwert der Blütenbüschel aus vier Parzellen pro Behandlungsvariante und der Anteil an befallenen und nicht-befallenen Blütenbüscheln sowie der Befall mit *E. amylovora* und der daraus berechnete Wirkungsgrad der einzelnen Behandlungsvarianten.

3. Ergebnisse

Tabelle 22: Boniturergebnisse der primär infizierten Apfelbäume. Für jeden Versuchsansatz standen vier Parzellen mit je 1 Baum zur Verfügung. Ein Baum jeder Parzelle wurde ca. 2 h nach der Behandlung mit einem *E. amylovora* Gemisch einer Dichte von 10^8 cfu / ml infiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte des primär infizierten Baumes sowie der prozentuale Befall und der Wirkungsgrad (WG) der Applikationen. Die Bonitur der primär infizierten Bäume erfolgte am 22.05.2013, 07.05.2014 bzw. 12.05.2015.

| Jahr | Behandlung | Blütenbüschel ☉ | | | Befall [%] | WG [%] |
|-------------|--------------|-----------------|----------|--------|------------|--------|
| | | - Befall | + Befall | Gesamt | | |
| 2013 | Unbehandelt | 23 | 112 | 135 | 85 | - |
| | Streptomycin | 62 | 44 | 106 | 41 | 52 |
| | LMA | 47 | 72 | 118 | 61 | 28 |
| | Ba FZB42 | 12 | 95 | 107 | 89 | 0 |
| | Ba FZB42+ | 26 | 77 | 103 | 78 | 9 |
| | Et DS08 | 35 | 97 | 132 | 72 | 15 |
| 2014 | Unbehandelt | 50 | 60 | 111 | 56 | - |
| | LMA | 80 | 25 | 106 | 24 | 56 |
| | Ba FZB42 | 68 | 34 | 102 | 34 | 39 |
| | Ba FZB42+ | 55 | 36 | 91 | 40 | 27 |
| | Et DS08 | 77 | 37 | 114 | 33 | 40 |
| | Et DS08+ | 39 | 49 | 88 | 55 | 1 |
| 2015 | Unbehandelt | 35 | 111 | 146 | 77 | - |
| | LMA | 57 | 80 | 137 | 59 | 23 |
| | Streptomycin | 88 | 53 | 141 | 38 | 50 |
| | Ba FZB42 | 49 | 89 | 138 | 64 | 16 |
| | Ba FZB42+ | 50 | 90 | 140 | 64 | 17 |
| | Et DS08 | 47 | 99 | 146 | 70 | 9 |
| | Et DS08+ | 40 | 93 | 133 | 71 | 8 |

3. Ergebnisse

Die Gesamtzahl an Blütenbüscheln pro Behandlungsvariante lag zwischen 88 und 146 pro primär infiziertem Baum. In der unbehandelten Kontrolle konnte 2013 ein Befall von 85% ($\pm 12\%$) nachgewiesen werden. Die 2013 getesteten Behandlungsvarianten wiesen Befallsstärken zwischen 41% ($\pm 2\%$) und 89% ($\pm 1\%$) auf. In Bezug auf die unbehandelte Kontrolle lässt sich der Wirkungsgrad der einzelnen Behandlungsvarianten bestimmen. Streptomycin zeigte 2013 die beste Wirkung mit 52% ($\pm 3\%$). Die mit LMA behandelten Varianten erreichten einen Wirkungsgrad von 28% ($\pm 12\%$). Die Antagonisten zeigten auf den primär infizierten Bäumen kaum einen Effekt auf *E. amylovora*. Der Wirkungsgrad schwankte zwischen 0% ($\pm 2\%$) (Ba FZB42) und 15% ($\pm 14\%$) (Et DS08).

2014 zeigten die Bäume der unbehandelten Kontrolle einen Befall von 56% ($\pm 6\%$). In diesem Versuchsjahr zeigte LMA den besten Wirkungsgrad mit 56% ($\pm 20\%$). Die Wirkungsgrade der *E. tasmaniensis* DS08 Behandlungsvarianten auf den primär infizierten Bäumen lagen bei 40% ($\pm 5\%$) ohne Additive. Die Variante mit Additiven wies keine Wirkung auf. Die Ansätze von *B. amyloliquifaciens* FZB42 zeigten unabhängig von dem Einsatz der Additive einen ähnlichen Wirkungsgrad von 27% ($\pm 13\%$) bis 39% ($\pm 20\%$) bei den primär infizierten Bäumen.

Im Feldversuch 2015 wurde Streptomycin als Vergleich für die LMA Wirkung wieder in den Versuch aufgenommen. Die Antagonisten-Ansätze wurden leicht variiert. Die Flüssigformulierung von *B. amyloliquifaciens* FZB42 wurde beibehalten und mit einem Nährstoffzusatz versetzt. Die Additiv-Variante enthielt neben den Nährstoffen zusätzlich Komponenten zum UV-Schutz und ein Netzmittel. Bei *E. tasmaniensis* DS08 wurden ebenfalls Nährstoffe zugesetzt, in der Variante mit Additiven wurde außerdem ein UV-Schutz hinzugefügt. Bei den primär infizierten Bäumen konnte ein Befall von 77% ($\pm 9\%$) in der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Die beste Wirkung 2015 erzielte das Antibiotikum Streptomycin mit einem Wirkungsgrad von 50% ($\pm 14\%$). LMA zeigte einen deutlich geringeren Effekt mit 23% ($\pm 21\%$). *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 zeigten (unabhängig von den Additiven) bei den primär infizierten Bäumen einen Wirkungsgrad von 8% ($\pm 13\%$) (Et DS08) bis 17% ($\pm 11\%$) (Ba FZB42).

Im Vergleich zu den primär infizierten Bäumen, bei denen eine Dichte von 1×10^8 cfu / ml des Feuerbrandregers appliziert wurde, werden die sekundär infizierten Bäume über die Übertragung des Erregers durch natürliche Vektoren infiziert. Dies entspricht eher den Bedingungen bei einem natürlichen Feuerbrandbefall.

3. Ergebnisse

Tabelle 23 zeigt eine Übersicht über den Befall und den Wirkungsgrad der Behandlungsvarianten auf sekundär infizierten Bäumen.

Tabelle 23: Boniturergebnisse der sekundär infizierten Apfelbäume im Feldversuch 2013. Für jede Behandlung standen vier Parzellen mit 8 bis 10 Bäumen zur Verfügung. Die Infektion erfolgte über natürliche Vektoren. Gezeigt sind die Mittelwerte der sekundär infizierten Bäume sowie der prozentuale Befall und der Wirkungsgrad der Applikationen. Die Bonitur erfolgte am 05.06.2013, 16.05.2014 bzw. 18.05.2015.

| Jahr | Behandlung | Blütenbüschel ☺ | | | Befall [%] | WG [%] |
|-------------|--------------|-----------------|----------|--------|------------|--------|
| | | - Befall | + Befall | Gesamt | | |
| 2013 | Unbehandelt | 416 | 125 | 540 | 24 | - |
| | Streptomycin | 471 | 17 | 488 | 4 | 85 |
| | LMA | 466 | 39 | 495 | 7 | 70 |
| | Ba FZB42 | 351 | 83 | 434 | 19 | 18 |
| | Ba FZB42+ | 373 | 98 | 470 | 20 | 14 |
| | Et DS08 | 492 | 56 | 548 | 10 | 57 |
| 2014 | Unbehandelt | 567 | 32 | 598 | 5 | - |
| | LMA | 628 | 13 | 642 | 2 | 61 |
| | Ba FZB42 | 585 | 31 | 616 | 5 | 12 |
| | Ba FZB42+ | 534 | 15 | 549 | 3 | 49 |
| | Et DS08 | 648 | 12 | 660 | 2 | 65 |
| | Et DS08+ | 583 | 20 | 603 | 3 | 40 |
| 2015 | Unbehandelt | 642 | 350 | 992 | 36 | - |
| | LMA | 921 | 185 | 1106 | 17 | 52 |
| | Streptomycin | 827 | 69 | 896 | 8 | 79 |
| | Ba FZB42 | 779 | 186 | 965 | 19 | 46 |
| | Ba FZB42+ | 676 | 162 | 839 | 19 | 46 |
| | Et DS08 | 814 | 129 | 943 | 14 | 61 |
| | Et DS08+ | 911 | 132 | 1043 | 13 | 65 |

3. Ergebnisse

Im Jahr 2013 konnte auf den sekundär infizierten Bäumen ein *E. amylovora* Befall von 24% (\pm 5%) in der unbehandelten Kontrolle erreicht werden. Streptomycin hatte mit 85% (\pm 5%) den höchsten Wirkungsgrad. *E. tasmaniensis* DS08 zeigte im ersten Versuchsjahr eine Wirkung von 57% (\pm 16%). Die Bäume, die mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen mit oder ohne *P. polymyxa* M1 Toxinen behandelt wurden, zeigten einen Wirkungsgrad von 14% (\pm 26%) bzw. 18% (\pm 42%) und waren damit deutlich weniger effektiv als *E. tasmaniensis* DS08.

Aufgrund der zuverlässigen Ergebnisse von LMA in den letzten Versuchsjahren (Fried 2013), wurde im Freilandversuch 2014 der Wirkungsgrad von LMA als Referenz für die übrigen Behandlungsvarianten verwendet. *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen wurden als Flüssigformulierung eingesetzt. Neben dem Sporenprodukt wurde auch eine Variante mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 und Additiven (Ba FZB42+) eingesetzt (siehe Tabelle 21). *E. tasmaniensis* DS08 wurde als Trockenprodukt eingesetzt. Außerdem wurde eine Behandlungsvariante mit Additiven getestet (Et DS08+). In der unbehandelten Kontrolle wurde ein Befall von 5% (\pm 1%) erreicht. Der Wirkungsgrad von LMA betrug 61% (\pm 14%). Die Sporenformulierung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zeigte wie schon im Vorjahr kaum Wirkung (12% \pm 15%). Die Zugabe der Additive hatte hingegen einen positiven Effekt und konnte den Wirkungsgrad auf 49% (\pm 11%) verbessern. Der Wirkungsgrad von *E. tasmaniensis* DS08 ohne Zusätze lag bei 65% (\pm 12%) und damit in einem ähnlichen Bereich wie LMA, während der Ansatz mit Additiven lediglich 40% (\pm 24%) Wirkungsgrad erzielte.

2015 lag der Befall mit *E. amylovora* in der unbehandelten Kontrolle bei 36% (\pm 4%). Streptomycin konnte den besten Effekt mit einem Wirkungsgrad von 79% (\pm 9%) erreichen. Im Vergleich dazu lag LMA bei einem Wirkungsgrad von lediglich 52% (\pm 14%). Der Antagonist *E. tasmaniensis* DS08 wies eine leicht bessere Wirkung mit knapp über 60% (\pm 22%) auf. Zwischen den beiden Varianten mit und ohne Additive zeigte sich kein Unterschied. Trotz des hohen Befalls erreichte *B. amyloliquefaciens* FZB42 einen Wirkungsgrad von 46% (\pm 9%). Auch bei der Behandlung mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 ließ sich zwischen den eingesetzten Varianten kein Unterschied feststellen.

Der Vergleich der mittleren Wirkungsgrade der getesteten Antagonisten in den drei Freilandversuchen ist in Abbildung 32 dargestellt.

3. Ergebnisse

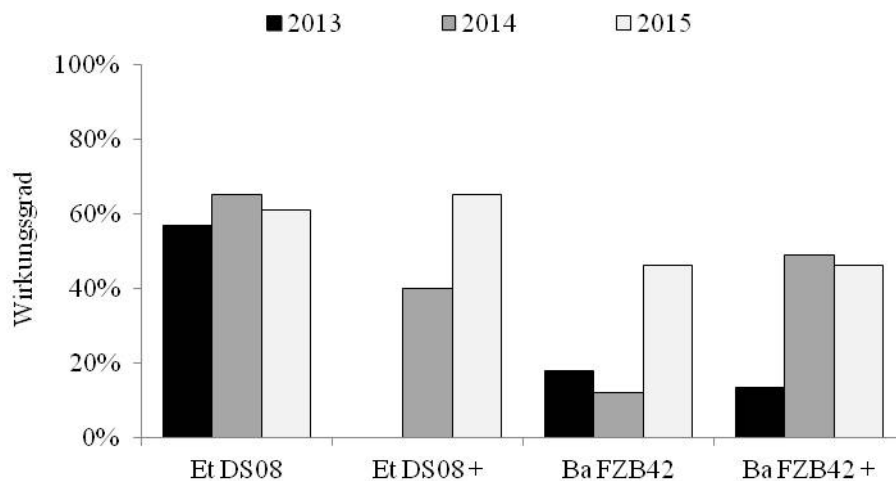


Abbildung 32: Wirkungsgrad der Antagonisten auf sekundär infizierten Bäumen in den drei Versuchsjahren. Wirkungsgerade von Et DS08 (2013, 2014, 2015), Et DS08 mit Additiven (2014, 2015), Ba FZB42 und Ba FZB42 mit Additiven (je 2013, 2014, 2015).

Die Trockenformulierung von *E. tasmaniensis* DS08 zeigte bei den unterschiedlichen Befallsstärken in der Anlage einen konstanten Wirkungsgrad von ca. 60% in allen drei Jahren. Die getesteten Additive im Jahr 2014 zeigten mit einem mittleren Wirkungsgrad von ca. 40% eine geringere Wirkung als die Behandlungsvariante ohne Additive (60%). Allerdings lag die Schwankung in der Additiv-Variante bei ca. 24%. 2015 wurde in den Additiven auf das Netzmittel bei *E. tasmaniensis* DS08+ verzichtet und der Wirkungsgrad war mit der Behandlungsvariante ohne Additive vergleichbar. Im Vergleich zu *E. tasmaniensis* DS08 zeigte *B. amyloliquifaciens* FZB42 eine schwächere Wirkung im Freiland. Im ersten Versuchsjahr 2013 lag der Wirkungsgrad in zwei Behandlungsvarianten (FZB42 Sporen bzw. FZB42 Sporen mit *P. polymyxa* M1 Toxinen) bei ca. 20%. 2014 wurde in der Additiv-Variante neben den *P. polymyxa* M1 Toxinen noch ein Netzmittel und Nährstoffe zugegeben. Der Wirkungsgrad der Behandlungsvariante mit Additiven lag bei ca. 50% und damit etwa 30% höher als die Variante ohne Additive. Im Jahr 2015 wurden beiden *B. amyloliquifaciens* FZB42 Behandlungsvarianten zusätzlich Nährstoffe zugesetzt. In der Additiv-Variante wurden darüber hinaus noch Netzmittel und *P. polymyxa* M1 Toxine zugesetzt. Beide Behandlungsvarianten erreichten einen vergleichbaren Wirkungsgrad von ca. 40%.

2.6.2.1 Schwankungsbereich des Bekämpfungsversuchs

Insgesamt schwankte der Befall in den einzelnen Wiederholungen (Abbildung 33). Im Fall der unbehandelten Kontrolle im lagen die Befallsstärken in den einzelnen Parzellen zwischen 17% und 28% (2013), 4% und 7% (2014) bzw. 32% und 42% (2015).

3. Ergebnisse

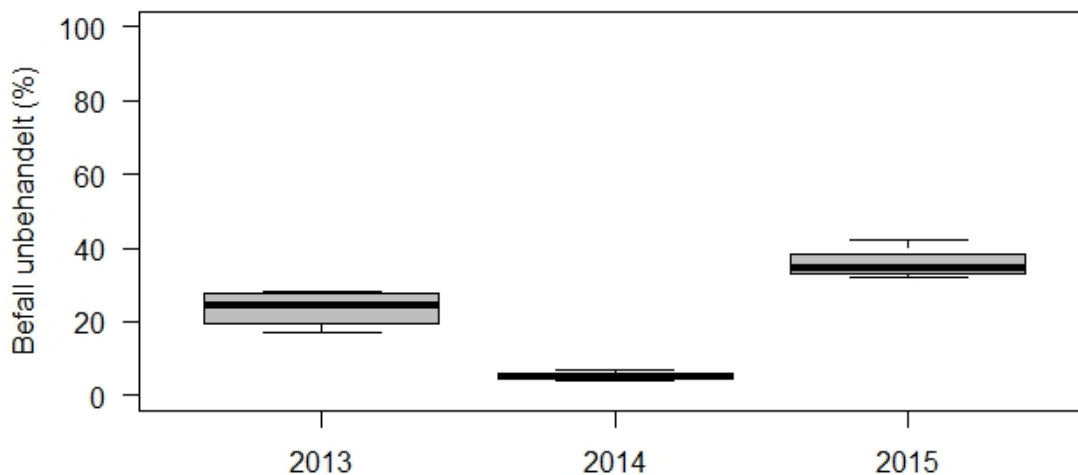


Abbildung 33: Boxplot zum Befall der sekundär infizierten Bäume in vier unbehandelten Parzellen in den Freilandversuchen 2013, 2014 und 2015.

Nicht nur der Befall in der unbehandelten Kontrolle, sondern auch in den behandelten Parzellen konnten deutliche Schwankungen der einzelnen Wirkungsgrade beobachtet werden. Abbildung 34 zeigt eine Übersicht über die Wirkungsgrade in vier Parzellen von LMA, Streptomycin, *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 im Freilandversuch 2015.

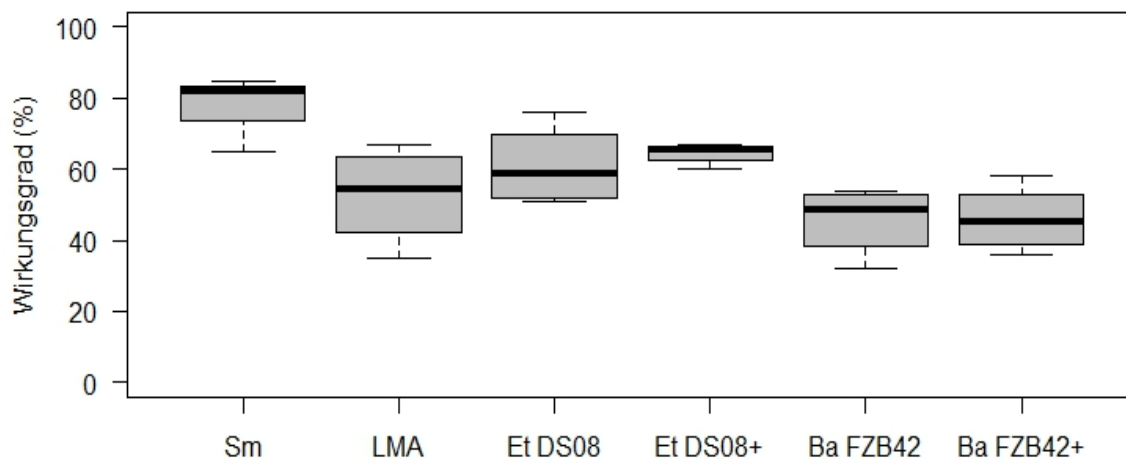


Abbildung 34: Übersicht über die Schwankungen des Wirkungsgrades auf sekundär infizierten Bäumen in vier Parzellen im Freilandversuch 2015.

Die Wirkungsgrade in den einzelnen Parzellen lagen bei *E. tasmaniensis* DS08 zwischen 51% und 76%. *B. amyloliquefaciens* FZB42 wies in den einzelnen Parzellen einen Wirkungsgrad zwischen 32% und 54% auf. Nicht nur die biologische Behandlungsvarianten, sondern auch die chemische Behandlungen mit LMA (zwischen 35% und 66%) bzw. Streptomycin (zwischen 65% und 85%) wiesen einen breite Schwankungsbereich in ihren Wirkungsgraden auf.

3. Ergebnisse

3.6.3 Etablierung und Verbreitung der Antagonisten im Freilandversuch

Die Wirkung der Antagonisten im Feld ist abhängig von ihrer Etablierung auf der Blüte. Die Ausbreitung und Verbreitung der Antagonisten im Freiland wurde daher - wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben - überprüft. Für den PCR-Nachweis von *E. tasmaniensis* wurden zwei Ansätze getestet: Zum einen wurde die DNA des Antagonisten aus der Blütenwaschprobe detektiert, zum anderen wurde eine Bio-PCR durchgeführt, bei der eine Kultur mit der Blütenwaschprobe angeimpft und über Nacht inkubiert wurde (vgl. Schaad et al. 1995). Als alternative Nachweismethode wurde das Ausplattieren der Blütenwaschprobe auf Selektionsmedium und die Bestimmung der Lebendzellzahl getestet. Dazu wurde ein Derivat von *B. amyloliquefaciens* FZB42 mit einer Spontanresistenz gegen Rifampicin verwendet.

3.6.3.1 PCR-Nachweis von *E. tasmaniensis* im Freiland

Abbildung 35 zeigt den Nachweis von *E. tasmaniensis* auf unbehandelten Bäumen in den Versuchsjahren 2013, 2014 und 2015.

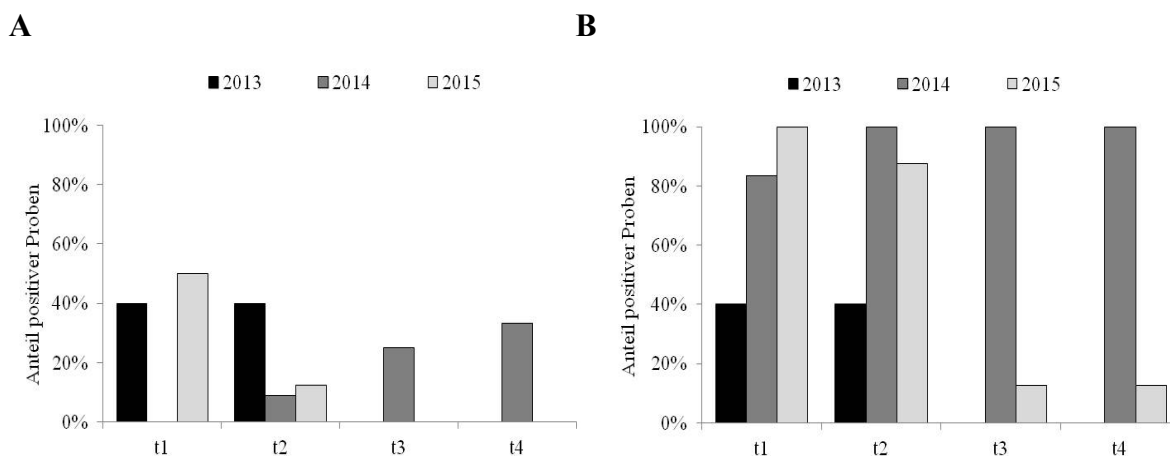


Abbildung 35: Anteil positiver Nachweise für *E. tasmaniensis* in Proben von unbehandelten Blüten im Freiland in drei Versuchsjahren. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von 4 Wochen. A: PCR der Waschprobe. B: Bio-PCR.

Der Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise in den Waschproben ist in Abbildung 35A dargestellt. 2013 war der Antagonist lediglich zu den Zeitpunkten t1 und t2 in 40% der Proben nachweisbar. 2014 gab es in der ersten Woche keinen positiven *E. tasmaniensis* Nachweis in der Waschprobe. In den darauffolgenden Wochen lagen weiterhin positive Nachweise vor, der Anteil lag zwischen 10% bis 40% der Proben. Im Jahr 2015 konnten dieselben Beobachtungen gemacht werden. In den ersten zwei Wochen des Versuches ließ sich *E. tasmaniensis* in 10% (t2) bis 50% (t1) der Proben detektieren, zum Ende des Versuches lag der Nachweis aus der Waschprobe jedoch bei 0%. In Abbildung 35B sind die Anteile positiver *E. tasmaniensis* Proben der Bio-PCR dargestellt.

3. Ergebnisse

Im Jahr 2013 konnte in der unbehandelten Kontrolle lediglich in den ersten beiden Wochen des Versuches *E. tasmaniensis* nachgewiesen werden (40% der Proben).

2014 war *E. tasmaniensis* über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar und das in 80% bis 100% der Proben. 2015 hingegen lagen die positiven Nachweise nur in den ersten zwei Wochen mit sehr hohen Anteilen (90% bis 100% der Proben) vor und nahmen in den letzten beiden Wochen deutlich ab (ca. 10% der Proben). Der Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise schwankte stark zwischen den beiden Methoden und war abhängig von der gewählten Vorverdünnung der Waschprobe (nicht gezeigt). Der Vergleich zwischen dem Nachweis aus der Waschprobe und der Bio-PCR zeigt, dass die Kultivierung der Proben eine höhere Nachweisquote brachte.

Eine aktive Wirkung auf den Feuerbranderreger wird vor allem durch lebende Antagonistenzellen erreicht. Im weiteren Verlauf sind daher die Ergebnisse der Bio-PCR dargestellt.

Abbildung 36 zeigt den Anteil der Proben mit einem positiven *E. tasmaniensis* Nachweis im Freilandversuch 2013 auf mit *E. tasmaniensis* DS08 behandelten Bäumen.

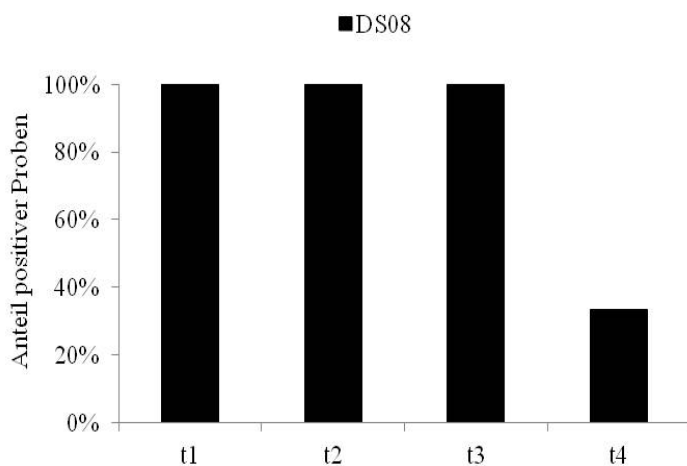


Abbildung 36: Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise in der Bio-PCR von *E. tasmaniensis* DS08 behandelten Bäumen (2013). Von drei Bäumen pro Ansatz wurden jeweils drei Blüten gesammelt und in 3 ml sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurden 900 µl LB mit 100 µl der Waschprobe angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von vier Wochen.

In den ersten drei Wochen konnte in 100% der Proben der Antagonist detektiert werden. Zum Zeitpunkt t4 sank der Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise auf ca. 30%.

Im Versuchsjahr 2014 wurden zwei Varianten von *E. tasmaniensis* DS08 ausgebracht: Eine Behandlungsvariante enthielt lediglich trockenformulierte Zellen (DS08), die andere Behandlungsvariante (DS08+) enthielt zusätzlich noch diverse Additive (siehe Tabelle 21). In Abbildung 37 sind die Anteile positiver PCR-Proben beider Varianten im Vergleich dargestellt.

3. Ergebnisse

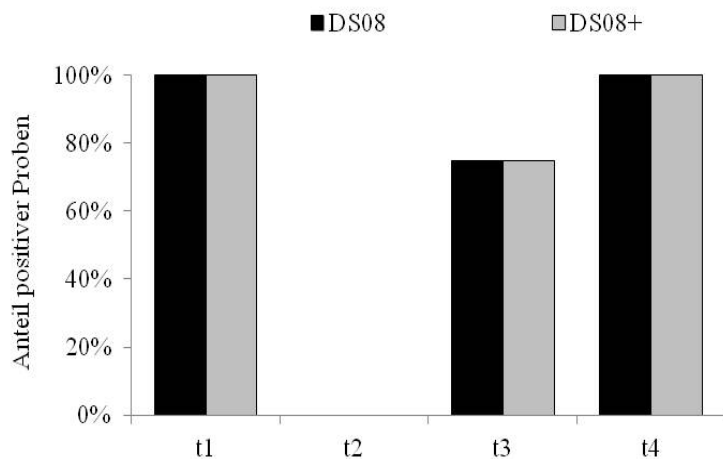


Abbildung 37: Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise in der Bio-PCR von *E. tasmaniensis* DS08 bzw. *E. tasmaniensis* DS08 mit Additiv behandelten Bäumen (2014). Von vier Bäumen pro Ansatz wurden jeweils fünf Blüten gesammelt und in 15 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurden 900 µl LB mit 100 µl der Waschprobe angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von vier Wochen.

Der Anteil positiver Nachweise unterschied sich in den beiden Varianten nicht voneinander. Zum Zeitpunkt t1 konnte in 100% der Proben *E. tasmaniensis* nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt t2 hingegen war kein *E. tasmaniensis* nachweisbar. Danach stieg die Detektion wieder deutlich auf etwa 80% (t3) bis 100% (t4) an.

Im Jahr 2015 traten vereinzelt Unterschiede zwischen den positiven *E. tasmaniensis* Nachweisen in den beiden Behandlungsvarianten *E. tasmaniensis* DS08 (DS08) und *E. tasmaniensis* DS08 mit Additiven (DS08+) auf (Abbildung 38).

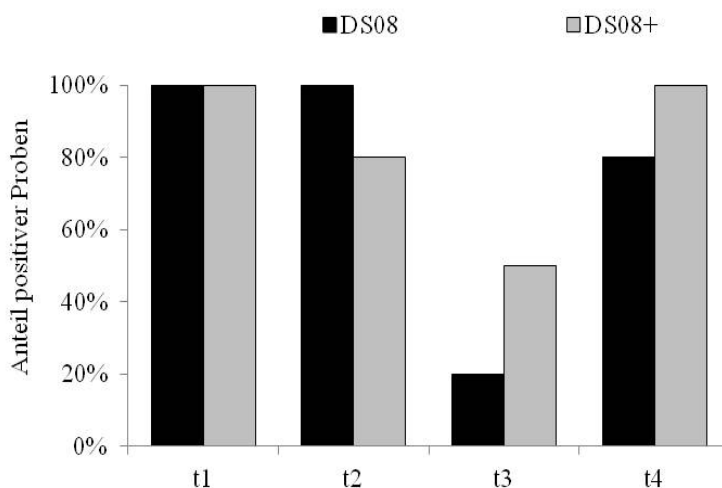


Abbildung 38: Anteil positiver *E. tasmaniensis* Nachweise in der Bio-PCR von *E. tasmaniensis* DS08 bzw. *E. tasmaniensis* DS08 mit Additiv behandelten Bäumen (2015). Zehn Blüten pro Ansatz wurden gesammelt und in je 1 ml sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurden 900 µl LB mit 100 µl der Waschprobe angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von vier Wochen.

3. Ergebnisse

Während zum Zeitpunkt t0 in 100% der Proben *E. tasmaniensis* nachweisbar war, nahm der Anteil zum Zeitpunkt t2 bei Ansatz mit Additiven um 20% ab. In der darauffolgenden Woche lag der Nachweis bei beiden Varianten deutlich niedriger bei ca. 20% (DS08) bis 50% (DS08+). Auch in diesem Versuchsjahr nahm der Anteil an detektiertem Antagonist zum Versuchsende wieder zu und lag bei bis zu 100% der Proben.

Die Ergebnisse zwischen den drei Jahren schwankten deutlich. Während 2013 ein Abfall der positiven Nachweise zum Ende des Versuches beobachtet werden konnte, stieg der Anteil 2014 und 2015 zu den späteren Zeitpunkten auf bis zu 100% an.

3.6.3.2 Detektion von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif im Feldversuch 2015

Der Nachweis von *B. amyloliquefaciens* erfolgte im Feldversuch 2015 über die Rifampicinresistenz des eingesetzten Derivates *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif. Wie in Kapitel 2.9.2 beschrieben wurde hierfür die Lebendzellzahl von *Bacillus* aus den Blütenwaschproben bestimmt. Abbildung 39 zeigt die cfu / Blüte, die auf unbehandelten und mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif behandelten Bäumen (in zwei Behandlungsvarianten mit und ohne Additive) bestimmt wurde.

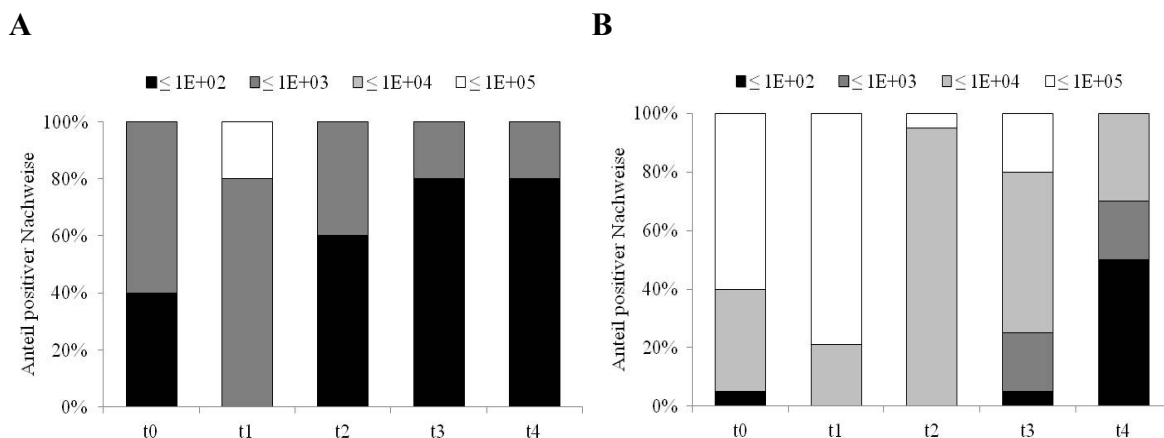


Abbildung 39: Anteil positiver *Bacillus* Proben in cfu / Blüte auf unbehandelten (A) und mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif behandelten Bäumen (B). Zehn Blüten pro Ansatz wurden gesammelt und in je 1 ml sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Probe bzw. entsprechende Verdünnungen auf Rif Platten ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von fünf Wochen. Die cfu wurde in Gruppen bis maximal 1x10², 1x10³, 1x10⁴ und 1x10⁵ cfu / Blüte eingeteilt. A: Nachweis von *Bacillus* auf unbehandelten Bäumen. B: Nachweis von *Bacillus* auf Ba FZB42 Rif behandelten Bäumen.

Zu allen getesteten Zeitpunkten konnte *Bacillus* in den Proben nachgewiesen werden. In der unbehandelten Kontrolle lag die Zelldichte zum Zeitpunkt t0 in 40% der Proben in einem Bereich bis maximal 1x10² cfu / Blüte und in 60% der Probe bei maximal 1x10³ cfu / Blüte. Zum Zeitpunkt t1 lag in 80% der Proben eine Zelldichte bis maximal 1x10³ cfu / Blüte und 20% bei maximal 1x10⁵ cfu / Blüte vor.

3. Ergebnisse

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren die nachgewiesenen *Bacillus* cfu in den *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif behandelten Ansätzen deutlich höher (Abbildung 39B). Bereits zu Versuchsbeginn (t0) konnten in 40% der Proben 1×10^4 cfu / Blüte und in 60% der Proben bis zu 1×10^5 cfu / Blüte nachgewiesen werden. Auch zum Zeitpunkt t1 lagen die cfus in diesem Bereich. In der darauffolgenden Woche (t2) konnte in 100% der Proben eine Zelldichte bis 1×10^4 cfu / Blüte nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt t3 nahm die cfu wieder ab. Bei der letzten Probennahme (t4) lagen 30% der Proben bei einer maximalen *Bacillus* Zelldichte bis 1×10^4 cfu / Blüte.

Der Nachweis von Blüten, die mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 behandelt wurden, ist in Abbildung 40 dargestellt. Verglichen wurden dabei die Behandlungsvarianten ohne (Abbildung 40A) und mit Additiven (Abbildung 40B). In der Behandlungsvariante, in der keine Additive eingesetzt wurden, konnten zum Zeitpunkt t0 in 60% Proben eine *Bacillus* Zelldichte von bis zu 1×10^4 cfu / Blüte und in 40% der Proben bis zu 1×10^5 cfu / Blüte bestimmt werden. Zum Zeitpunkt t1 konnte in beiden Ansätzen eine Zunahme der Zellzahlen beobachtet werden, ab dem Zeitpunkt t3 reduzierte sich die cfu / Blüte allmählich.

Die Abnahme war unabhängig von den zugegeben Additiven, allerdings ließ sich bei der Behandlung ohne Zusatz eine etwas stärkere Reduzierung feststellen. Zum Versuchsende konnten in 60% der Proben lediglich maximal 100 cfu / Blüte nachgewiesen werden. Bei dem Ansatz mit Additiv lagen bei 50% der Proben noch Zelldichten bis 1×10^4 cfu / Blüte vor.

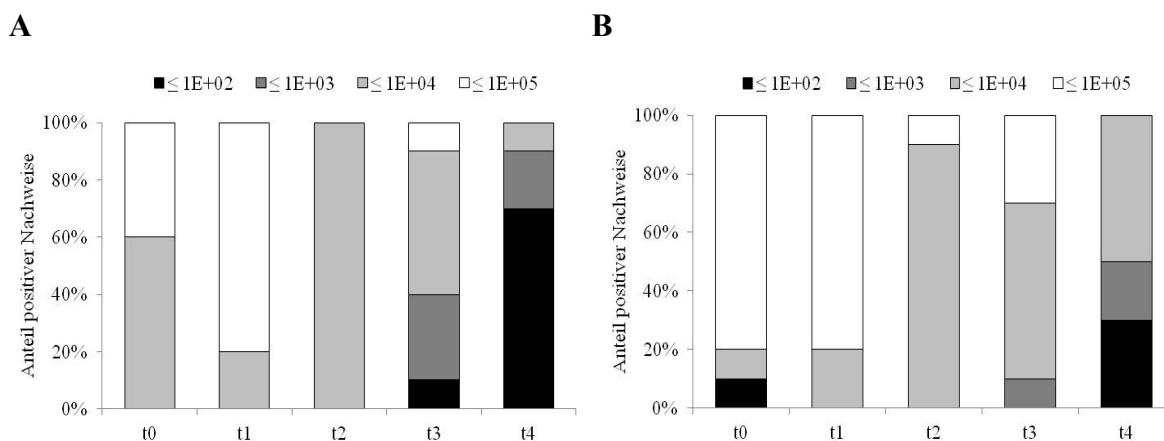


Abbildung 40: Anteil positiver *Bacillus* Proben in cfu / Blüte auf Bäumen mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif (A) bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif mit Additiv (B) Behandlung. Zehn Blüten pro Ansatz wurden gesammelt und in je 1 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Probe bzw. entsprechende Verdünnungen auf Rif Platten ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Gezeigt ist der Anteil positiver Nachweise in wöchentlichen Abständen über einen Zeitraum von fünf Wochen. Die cfu wurde in Gruppen bis maximal 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 cfu / Blüte eingeteilt. A: Nachweis von *Bacillus* auf Ba FZB42 Rif behandelten Bäumen. B: Nachweis von *Bacillus* auf Ba FZB42 Rif mit Additiv behandelten Bäumen.

3. Ergebnisse

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen von Feuerbrandantagonisten

Die in Kapitel 1.3.1.1 beschriebene Tn5 Mutante von *E. tasmaniensis* 1/99 weist im Vergleich zum Wildtyp einen gelb-pigmentierten Phänotyp auf, der in Flüssigkultur eine Kahmhaut- und Klumpen bildet. Diese Eigenschaften könnten das Überleben auf der Pflanze und damit den Antagonismus gegen den Feuerbranderreger begünstigen.

| Hit | Description | E-value | %Identity | %Gaps |
|----------|---|-----------|-----------|-------|
| CU468135 | <i>Erwinia tasmaniensis</i> strain ET1/99 complete chromosome | 0,00 | 100,00 | 0,00 |
| FN434113 | <i>Erwinia amylovora</i> CFBP1430 complete genome | 2,81E-129 | 87,57 | 0,00 |
| FN666575 | <i>Erwinia amylovora</i> ATCC 49946 chromosomal sequence | 2,81E-129 | 87,57 | 0,00 |
| FR719189 | <i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158, whole genome shotgun sequence, contig 9 | 3,42E-128 | 87,30 | 0,00 |
| CP002124 | <i>Erwinia</i> sp. Ejp617, complete genome | 3,42E-128 | 87,14 | 0,00 |
| FN392235 | <i>Erwinia pyrifoliae</i> DSM 12163 complete genome, culture collection DSM:12163 | 4,17E-127 | 86,88 | 0,00 |
| FP236842 | <i>Erwinia pyrifoliae</i> strain Ep1/96 complete chromosome | 4,17E-127 | 86,88 | 0,00 |
| FP236843 | <i>Erwinia billingiae</i> strain Eb661 complete chromosome | 4,76E-82 | 78,53 | 0,52 |
| CP009866 | <i>Pantoea</i> sp. PSNIH2, complete genome | 2,31E-73 | 76,58 | 0,00 |
| CP011427 | <i>Cedecea neteri</i> strain ND02, complete genome | 7,55E-67 | 75,33 | 0,79 |
| CP009454 | <i>Pantoea rwandensis</i> strain ND04, complete genome | 3,91E-64 | 74,80 | 0,79 |
| HE617160 | <i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342 main chromosome complete genome | 3,91E-64 | 74,80 | 0,79 |
| AP012032 | <i>Pantoea ananatis</i> AJ13355 DNA, complete genome | 1,66E-62 | 74,54 | 0,79 |
| CP001875 | <i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103, complete genome | 1,66E-62 | 74,54 | 0,79 |
| CP014207 | <i>Pantoea ananatis</i> strain R100, complete genome | 2,03E-61 | 74,28 | 0,79 |

Abbildung 41: Nukleinsäure-BLAST der *ymoB* Sequenz von *E. tasmaniensis* 1/99.

Die Insertion des Mini Tn5 Transposons in die Mutante No. 5 von *E. tasmaniensis* 1/99 Sm liegt in *ymoB*, dessen Sequenz in der Gattung der *Erwinien* hochkonserviert ist (nicht publiziert). Zwischen dem Antagonisten *E. tasmaniensis* und dem Feuerbrandpathogen *E. amylovora* liegt eine Sequenzidentität von ca. 88% vor (Abbildung 41). Die Funktion des Proteins YmoB ist in beiden Organismen nicht abschließend geklärt.

3.7.1 Konstruktion von Plasmiden zur Komplementation von *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB::Tn5_Km*

Zur Komplementierung der Mutante *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB::Tn5_Km* wurden Plasmide mit den Genen des *ymo* Operons (*ymoB*, *ymoA* und *ymoBA*) konstruiert. Dabei wurde nicht nur auf *E. tasmaniensis* 1/99, sondern auch auf *E. amylovora* 1/79 zurückgegriffen. Dies diente der Untersuchung einer möglichen homologen Funktion zwischen Antagonist und Pathogen. Die verwendeten Primerkombinationen zur Amplifizierung von *ymoBA*, *ymoA* und *ymoB* sind in Tabelle 15 aufgelistet. Die Größen der amplifizierten PCR-Produkte und die Spezifität der PCR wurden auf dem Agarosegel überprüft (Abbildung 42). Die PCR-Produkte wurden - wie in Kapitel 2.7.12 - beschrieben in den Vektor p3T ligiert. Die Plasmide pYa-Ea, pYba-Ea, pYa-Et, pYb-Et, pYba-Et (siehe auch Tabelle 5) konnten erfolgreich hergestellt werden, lediglich die Konstruktion des Plasmids pYb-Ea war im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich.

3. Ergebnisse

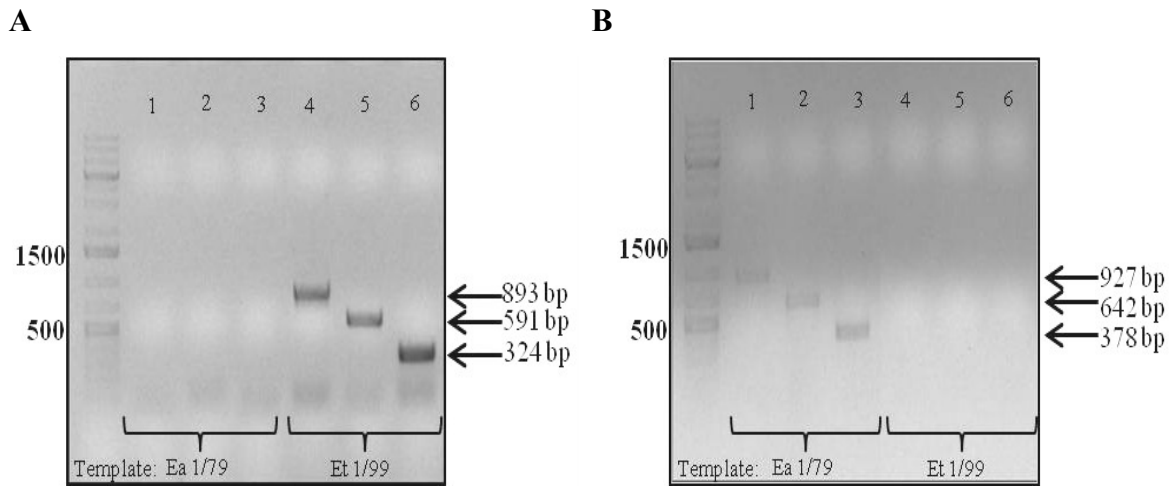


Abbildung 42: Produkte der *ymo* PCR in *E. tasmaniensis* 1/99 (A) und *E. amylovora* 1/79 (B). A: Amplifizierung von Et *ymoBA* (893 bp), Et *ymoB* (591 bp) und Et *ymoA* (324 bp). Spur 1-3: Einsatz von Ea 1/79 als Template DNA. Spur 4-6: Einsatz von Et 1/99 als Template DNA. B: Amplifizierung von Ea *ymoBA* (927 bp), Ea *ymoB* (642 bp), Ea *ymoA* (378 bp). Spur 1-3: Einsatz von Ea 1/79 als Template DNA. Spur 4-6: Einsatz von Et 1/99 als Template DNA.

Der Ligation des korrekten und vollständigen Inserts in den Vektor wurde über einen - wie in Kapitel 2.7.11 - beschriebenen Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI kontrolliert und die Fragmentgrößen des Inserts überprüft (Abbildung 43A).

Über eine PCR ausgehend von auf dem Plasmid vorliegenden *lacZ* und der reversen Bindestelle des Inserts wurde außerdem die Orientierung des Inserts überprüft (Abbildung 43B).

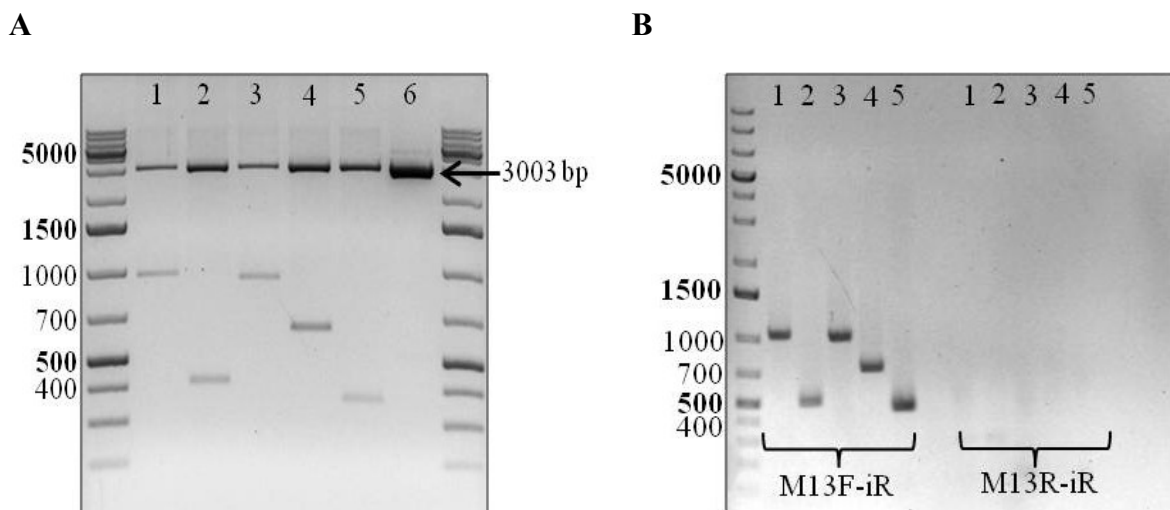


Abbildung 43: Überprüfung der Plasmide zur Komplementation *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km durch Restriktionsverdau (A) und PCR (B). A: Die Plasmide wurden mit *Eco*RI/*Bam*HI verdaut und zeigen die erwarteten Fragmente von 1: pYba-Ea, 927 bp 2: pYa-Ea, 378 bp 3: pYba-Et, 893 bp 4: pYb-Et, 591 bp 5: pYa-Et, 324 bp 6: p3T, 3003 bp. B: Überprüfung der Insertorientierung in Relation zu P_{lac} via PCR mit den reverse Primern des Inserts und M13F bzw. M13R. 1: pYba-Ea, 1053 bp 2: pYa-Ea, 504 bp 3: pYba-Et, 1019 bp 4: pYb-Et, 717 bp 5: pYa-Et, 450 bp

3. Ergebnisse

In den fünf Plasmiden konnte die Forward-Orientierung des Inserts nachgewiesen werden, wodurch die Expression der eingebrachten Gene ermöglicht wird. Der Kontrollansatz mit dem Primer M13R und dem reverse Primer des Inserts zeigte entsprechend kein Produkt und bestätigte somit die Orientierung des Inserts in Forward-Richtung.

3.7.2 Komplementation der Mutante *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km

Die Plasmide wurden, wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben, in kompetente Zellen der *E. tasmaniensis* Sm 1/99 Tn5_No.5 Mutante transformiert. Die Koloniemorphologie der transformierten Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp *E. tasmaniensis* 1/99 ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Komplementierung von *ymoB* allein reichte nicht aus, um den Phänotyp der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm Tn5_No. 5 Mutante zu komplementieren (e, f). Die Stämme zeigten eine gelbe Pigmentierung, die mit der Mutante vergleichbar ist. Lediglich die Komplementation mit *ymoBA* (b, c) zeigte in Bezug auf die Pigmentierung einen Phänotyp, der dem Wildtyp von *E. tasmaniensis* 1/99 entspricht. Die Stämme, die mit *ymoA* komplementiert wurden (a, d), zeigten eine cremefarbige Koloniefarbe und sind mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Expression der Gene von *E. tasmaniensis* 1/99 oder von *E. amylovora* 1/79 scheint keinen Einfluss auf die Komplementation zu haben.

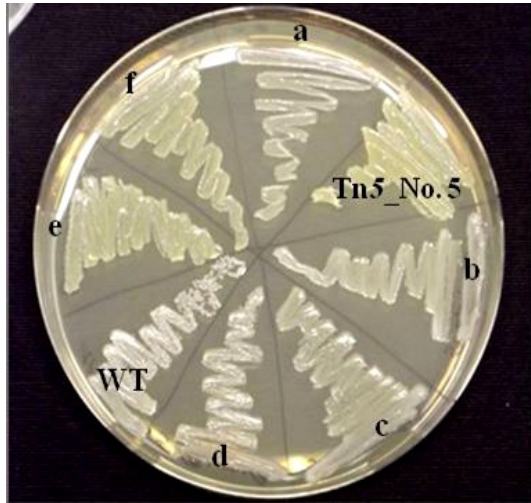


Abbildung 44: Vergleich der Koloniemorphologie der transformierten Transposonmutante *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km (Tn5_No. 5). Zellmaterial wurde auf ST.I frisch ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert. a: Tn5_No. 5 + pYa-Et, b: Tn5_No. 5 + pYba-Et, c: Tn5_No. 5 + pYba-Ea, d: Tn5_No. 5 + pYa-Ea, e,f: Tn5_No. 5 + pYb-Et.

Die Bildung der Kahmhaut und Klumpen in Flüssigkultur konnte ebenfalls lediglich bei den Zellen mit dem entsprechenden Plasmid mit *ymoBA* bzw. *ymoA* komplementiert werden. Durch die Transformation des Plasmids pYb-Et konnte der Phänotyp von *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km nicht komplementiert werden.

3. Ergebnisse

3.7.3 Untersuchungen zur Adhäsion von *E. tasmaniensis* 1/99

Ein auffälliges Merkmal der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante ist die verstärkte Anheftung an Oberflächen. Daher wurde die Adhäsion der Mutante und ihrer Komplementation im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs zur Oberflächenanheftung nach der in Kapitel 2.5.5 beschriebenen Methode.

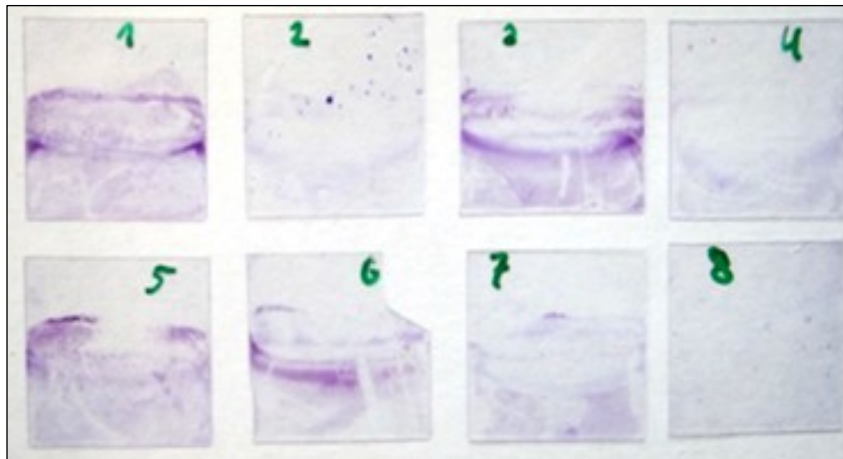


Abbildung 45: Adhäsion des *E. tasmaniensis* 1/99 Wildtyps und der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante auf Deckgläsern. In einer 12-Well Platte wurden 300 µl LB mit einer Dichte von OD₆₀₀ 0,05 angeimpft und Deckgläschen eingestellt. Nach Inkubation über Nacht bei 28°C wurden die angehefteten Zellen mit 0,1%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. 1: Tn5_No. 5, 2: Tn5_No. 5 + pYba-Ea, 3: Tn5_No. 5 + pYa-Ea, 4: Tn5_No. 5 + pYb-Et, 5: Tn5_No. 5 + pYb-Et, 6: Tn5_No. 5 + pYa-Et, 7: Et WT, 8: LB

Die Kristallviolett-Färbung zeigte eine hohe Dichte von Zellen der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante auf dem abgebildeten Deckgläschen (1). Dieser Bereich des Deckgläschens lag mit dem Teil des Mediums in Kontakt, an der sich eine Kahlhaut bildete. Die Zelldichte in diesem Bereich war vergleichbar mit *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km mit den Plasmiden pYba-Ea (3) bzw. pYa-Et (6) und pYb-Et (5). Die Komplementation von *ymoBA* (2, 4) bewirkte eine Anheftung der Zellen auf Wildtyp-Niveau (7).

Der quantitative Nachweis zur Adhäsion (siehe Kapitel 2.5.6) zeigte ein ähnliches Ergebnis und ist in Abbildung 46 dargestellt. Der *E. tasmaniensis* 1/99 Wildtyp (WT) wies nur eine geringe Oberflächenanheftung auf, ebenso wie die komplementierten Mutantensämme mit *ymoBA* aus *E. amylovora* 1/79 (5 + pYba-Ea) sowie aus *E. tasmaniensis* 1/99 (5 + pYba-Et). Nach 24 h war die Anheftung der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante (5) um etwa das Vierfache höher als der Wildtyp. Die Transformation mit *ymoB* aus *E. tasmaniensis* 1/99 (5 + pYb-Et) allein konnte die Mutante nicht komplementieren.

3. Ergebnisse

Auch die Zugabe von *ymoA* (5 + pYa-Ea, 5 + pYa-Et) hatte keinen großen Einfluss auf die Stärke der Adhäsion. Lediglich die Komplementation von *ymoBA* - unabhängig vom genetischen Ursprung aus *E. amylovora* 1/79 oder *E. tasmaniensis* 1/99 - zeigte eine Anheftung auf Wildtypniveau (5 + pYba-Ea, 5 + pYba-Et). Eine längere Inkubationszeit von 48 h hatte keinen weiteren Einfluss auf die Adhäsion der getesteten Stämme.

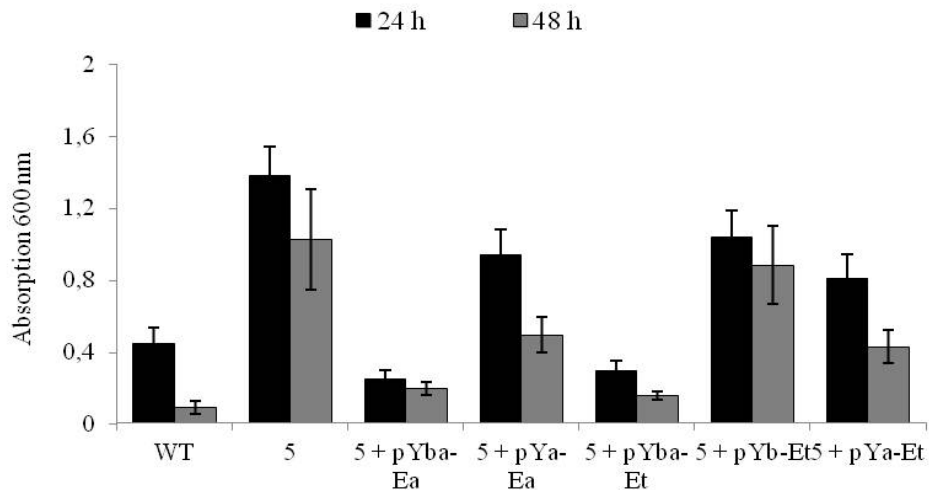


Abbildung 46: Quantitativer Nachweis zur Adhäsion des *E. tasmaniensis* 1/99 Wildtyps und der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante (5). Ein Gesamtvolumen von 200 µl LB in einer 96-Well Platte wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und 24 h bzw. 48 h bei 28°C inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden mit 0,1%iger Kristallviolettlösung gefärbt und in 99% Ethanol aufgenommen. Daraufhin wurde die Absorption bei 600 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwölf Wiederholungen eines Versuches.

3.7.4 Überprüfung von Anheftung und Hemmwirkung auf *in vitro* Pflanzen

Auf *in vitro* Pflanzen wurde überprüft, ob die *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante durch die verstärkte Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp einen Vorteil bei der Anheftung auf der Pflanzenoberfläche hat. Im Zeitverlauf von einer Woche wurde daher die cfu pro Blatt auf Pflanzen überprüft, die nach Kapitel 2.8.3.1 behandelt wurden. Der Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante ist in Abbildung 47 dargestellt. Zwischen den Pflanzen, die mit dem *E. tasmaniensis* 1/99 Wildtyp und mit der *E. tasmaniensis* 1/99 *ymoB*::Tn5_Km Mutante behandelt wurden, konnte im Zeitverlauf kein Unterschied zwischen den cfus pro Blatt beobachten werden.

Nach der Applikation lagen die Zellzahlen bei ca. 5×10^5 cfu / Blatt (WT) bzw. 2×10^5 cfu / Blatt (Tn5_No. 5). Über den Zeitverlauf von einer Woche lagen die Zelldichten in diesem Bereich und es konnte kein Vorteil der Mutante beobachtet werden.

3. Ergebnisse

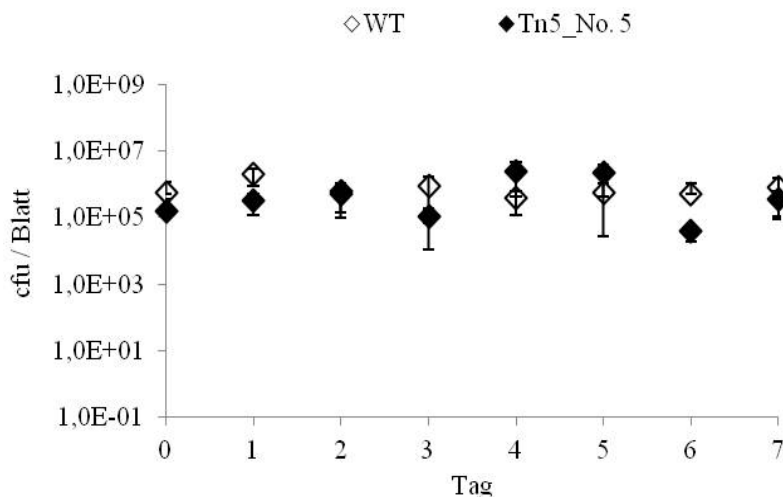


Abbildung 47: Entwicklung der *E. tasmaniensis* 1/99 Sm *ymoB*::Tn5_Km Mutante (Tn5_No. 5) auf *in vitro* Äpfeln im Vergleich zum Wildtyp. Von einer frischen Übernachtskultur der Tn5_Mutante wurden *in vitro* Pflanzen mit 1×10^8 cfu / ml gleichmäßig besprüht. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurden fünf Einzelblätter in H₂O (100 mg /ml) unter starkem Schütteln 10 min gewaschen und in der Mikrotiterplatte eine 1:10 Verdünnungsreihe angelegt. Als Kontrolle wurde der Et 1/99 Wildtyp (WT) verwendet. Verschiedene Verdünnungsstufen wurden auf St. I Medium plattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu pro Blatt bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines Versuches.

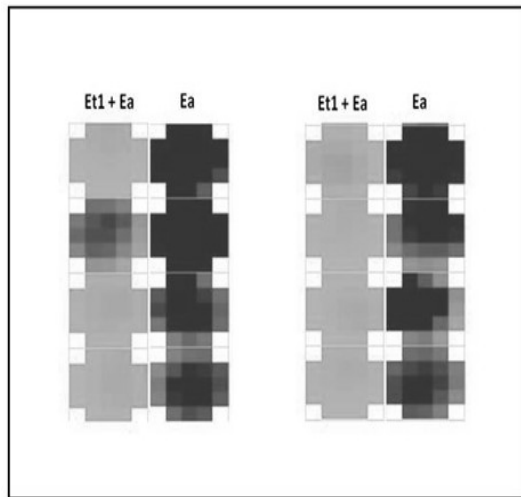
3.8 Entwicklung eines Hochdurchsatz - Screening Systems für Feuerbrandantagonisten *in planta*

Für einen in der Praxis einsetzbaren Antagonisten ist die Wirkung auf der Pflanze entscheidend. Welche Eigenschaften eine essentielle Rolle bei der Hemmung von *E. amylovora* auf der Pflanze haben, ist nicht vollständig geklärt. Mittels zufälliger Mutagenese lassen sich, in unterschiedlichsten Eigenschaften eingeschränkte, Mutanten erzeugen. Diese können einen essentiellen Einfluss auf den Antagonismus gegen *E. amylovora* haben. Um die Gene, die bei der Wirkung gegen den Feuerbranderreger auf der Pflanze eine Rolle spielen zu identifizieren, müssen Mutanten in einen *in planta* System auf den Verlust ihrer antagonistischen Wirkung gescreent werden. Für eine gesättigte Mutagenese müssen allerdings mehrere 10000 Mutanten untersucht werden. Entsprechend hoch muss der Durchsatz des Screening-Verfahrens sein. Für den in der Feuerbrandforschung eingesetzten Standard-Birnenscheibenassay werden 3-5 mm dicke Scheiben von unreifen Birnen verwendet (Wrather et al. 1973). Die Birnenscheiben werden bei Hemmversuchen in einer hochkonzentrierten Antagonistensuspension (bis 1×10^8 cfu / ml) gebadet und anschließend mit *E. amylovora* (zwischen 500 und 5000 cfu / Birnenscheibe) inokuliert.

Nach einigen Tagen kann die Symptomentwicklung auf der Birne untersucht werden. Um einen höheren Durchsatz zu erreichen, wurde der Birnenscheiben-Assay im Rahmen dieser Arbeit - wie in Kapitel 2.8.2.1 beschrieben - auf ein 96-Well Format angepasst.

3. Ergebnisse

A



B

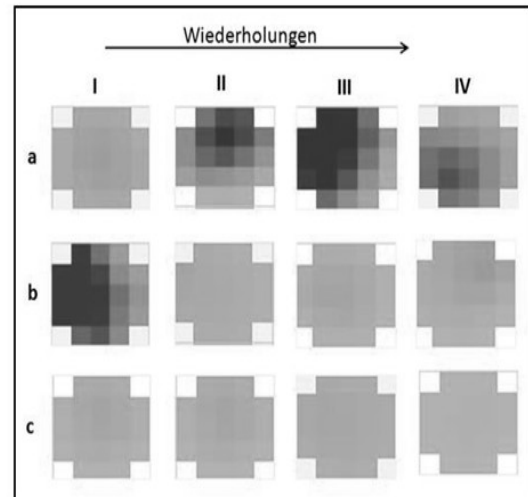


Abbildung 48: Fluoreszenzsignal des Reporterstammes *E. amylovora* 222_JKI pKAN auf unbehandelten und mit *E. tasmaniensis* 1/99 behandelten Birnen im 96-Well Format. Bei der Behandlung wurden 10 μ l Antagonistensuspension auf die Birnenoberfläche pipettiert. Die Inokulation mit Ea222 GFP erfolgte mit 5000 cfu / 5 μ l. Gezeigt ist die Fluoreszenz nach drei Tagen Inkubation. Der Farbverlauf von grau zu schwarz zeigt die Signalintensität an. A: Kontrollen von unbehandelten (Ea) und behandelten (Et1 + Ea) Birnenscheiben. B: Messung der Fluoreszenz bei Behandlung mit Et 1/99 in mehreren Wiederholungen.

Für die Detektion des Pathogens auf der Birne wurde ein fluoreszierender Reporterstamm von *E. amylovora* (Ea 222_JKI pKAN) verwendet. Aufgrund der Größe und der kurzen Haltbarkeit der Birnenscheiben sind Symptome nur bedingt zu erkennen. Die Detektion der Fluoreszenz ermöglicht einen sensitiven Nachweis der Pathogenaktivität. Die Messung der Fluoreszenz nach drei Tagen Inkubation der Birnenscheiben zeigte ein starkes Signal der Positivkontrolle (Ea) mit einer sehr hohen Intensität.

Im Vergleich dazu war auf Birnenscheiben, die mit *E. tasmaniensis* 1/99 behandelt und anschließend mit *E. amylovora* 222_JKI pKAN inokuliert wurden (Et1 + Ea), in der Regel kaum Fluoreszenz messbar (Abbildung 48A). Vereinzelt traten kleine Bereiche mit einer schwachen Fluoreszenz auf, die in Wiederholung allerdings nicht auftraten. Dieses Ergebnis zeigte, dass die antagonistische Hemmung von *E. tasmaniensis* über die Messung der abgegebenen Fluoreszenz des *E. amylovora* Reporterstammes auf der Birnenscheibe in diesem Format bestimmt werden kann. In Abbildung 48B sind drei Beispiele von Messergebnissen dargestellt. Die Behandlung in Abbildung 47B (a) zeigte nach der Infektion in drei von vier Wiederholungen ein Fluoreszenzsignal, wobei die gemessene Intensität pro Birnenscheibe schwankte.

In Abbildung 46B (b) konnte lediglich in einem Fall ein Signal gemessen werden, in Abbildung 47B (c) in keinem der Ansätze. Diese Ergebnisse zeigten den Schwankungsbereich des Assays.

3. Ergebnisse

In Abbildung 49 sind die Mittelwerte der rel. Fluoreszenz von *E. amylovora* 222_JKI auf Birnenscheiben dargestellt, die mit *E. tasmaniensis* 1/99 behandelt wurden. Die Fluoreszenz des Reporterstannes schwankten auf den Birnenscheiben zwischen 23000 bis 78000 rel. Fluoreszenzeinheiten. Am auffälligsten waren die Ergebnisse der Durchläufe X3, X4, X9 und X16.

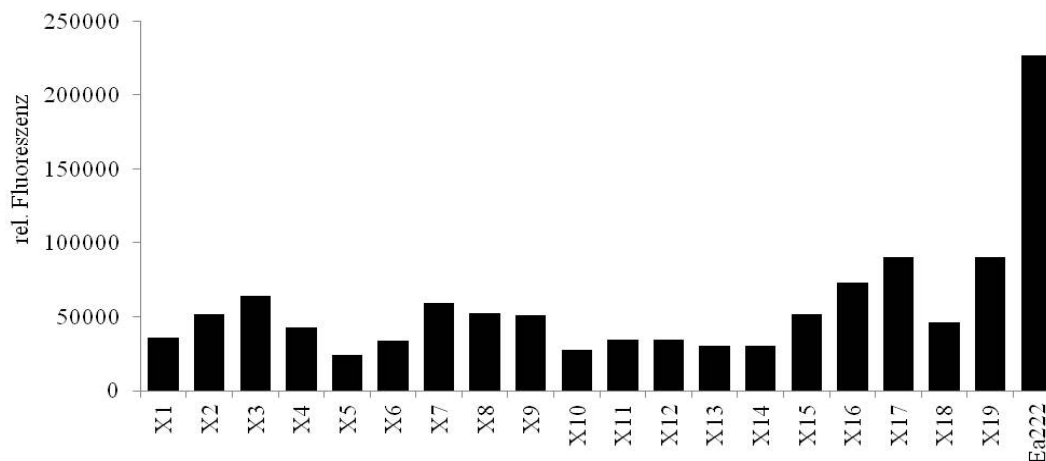


Abbildung 49: Fluoreszenz von *E. amylovora* 222_JKI pKAN auf Birnenscheiben nach Behandlung mit *E. tasmaniensis* 1/99 Sm (X). Nach drei Tagen wurde im Platerreader die relative Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle diente Ea222 GFP auf unbehandelten Birnenscheiben. In der Grafik sind die Mittelwerte von drei Versuchen à vier Wiederholungen pro Variante gezeigt.

Um zu analysieren, inwieweit das entwickelte *in planta* Screening trotz der starken Schwankung nutzbar ist, wurden die Fluoreszenzintensitäten auf der Birnenscheiben in einem Boxplot verglichen (Abbildung 50). Dabei wurden die einzelnen Messwerte des 5x5 Well Scans analysiert, wobei eine inhomogene Verteilung auf der Birnenscheibe beobachtet werden konnte.

Die Median der Positivkontrolle (Ea222_JKI pKAN) lag bei über 250000 rel. Fluoreszenzeinheiten. Bei den Birnenscheiben, die mit *E. tasmaniensis* 1/99 behandelt wurden, lag der Median bei maximal 50000 rel. Fluoreszenzeinheiten (X3, X4, X9). Der Boxplot zeigt, dass bei diesen Durchläufen eine ungleichmäßige Verteilung der Werte vorlag. Im Gegensatz zu den Mittelwerten lag der Bereich des Medians zwischen 17000 und 52000 rel. Fluoreszenzeinheiten.

3. Ergebnisse

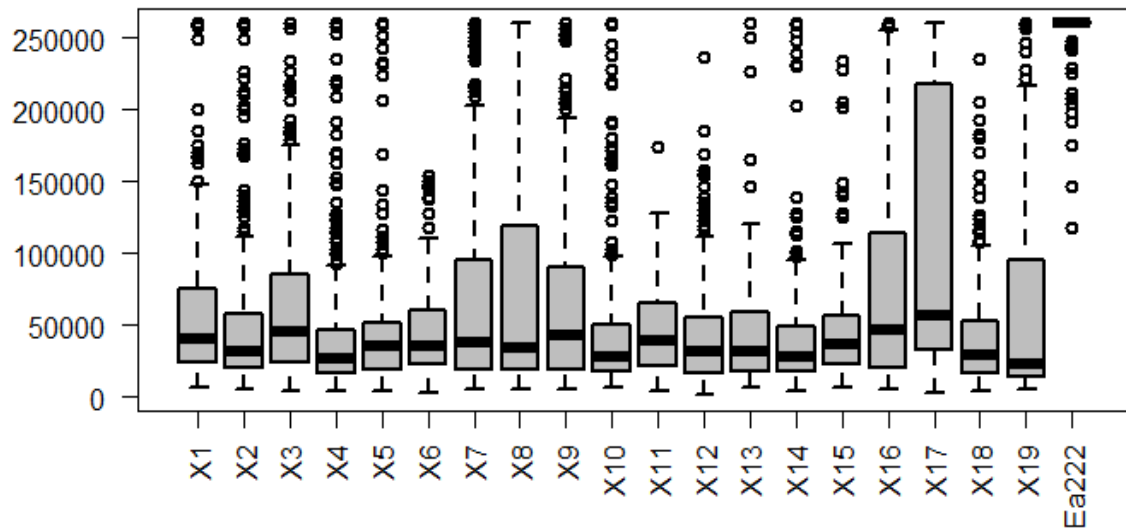


Abbildung 50: Boxplot-Analyse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von *E. amylovora* 222_JKI pKAN auf Birnenscheiben behandelt mit *E. tasmaniensis* 1/99 Sm (X). Bei der Behandlung wurden 10 µl Antagonistensuspension auf die Birnenoberfläche pipettiert. Die Inokulation mit Ea222 GFP erfolgte mit 5000 cfu / 5 µl. Gezeigt ist die Fluoreszenz nach drei Tagen Inkubation. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen.

4. Diskussion

Der Einsatz von bakteriellen Antagonisten gegen *E. amylovora* stellt eine Möglichkeit zur biologischen Kontrolle des Feuerbrandes dar. Sowohl der Gram-negative Antagonist *E. tasmaniensis* als auch der Gram-positive *B. amyloliquefaciens* zeigten in Labor- sowie in Freilandversuchen eine Wirkung auf den Feuerbranderreger. In Hinblick auf eine Anwendung in der Praxis wurden formulierte Zellen als Produktmuster für die Versuche zur Verfügung gestellt, die auf der Pflanze und im Freiland getestet wurden. Unterschiede in der Wirkungsweise und der Anpassung an das natürliche Habitat des Feuerbranderregers können eine Rolle bei der unterschiedlichen Effizienz im Freiland spielen.

4.1. *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 als Antagonisten gegen den Feuerbrand

4.1.1 Hemmwirkung und Wirkungsmechanismus

Bogs et al. (1998) beschrieben bei dem Reporterstamm *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux eine Korrelation zwischen Zellwachstum und Lichtemission. Um in einer Mischkultur die Hemmwirkung von Antagonisten auf den Feuerbranderreger zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Ko-Kultivierungsassay etabliert. Dabei wurde die Wirkung von Antagonisten auf das Feuerbrandpathogen über die maximale Lumineszenz des Reporterstammes überprüft. Bei Ko-Kultivierung von *E. tasmaniensis* DS08 bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux zeigte sich ein eindeutiger Hemmeffekt auf den Feuerbranderreger. Um zu prüfen, inwieweit sich die Antagonisten auch bei einem geringeren Anteil in der Ko-Kultur durchsetzen können, wurden Kulturen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Antagonist zu Pathogen im Inokulum angeimpft. Auch bei einem 3,2-fachen Überschuss des Pathogens waren sowohl *E. tasmaniensis* DS08 als auch *B. amyloliquefaciens* FZB42 noch in der Lage den Reporterstamm deutlich zu hemmen (um ca. 70%). In Ko-Kultur konnten beide Antagonisten *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux somit gleich gut hemmen.

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist es wahrscheinlich, dass beide Antagonisten unterschiedliche Wirkungsmechanismen gegen den Feuerbranderreger aufweisen. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein Hemmtest durchgeführt, bei der die Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux durch Zugabe von Kulturüberstand des Antagonisten untersucht wurde. Die Versuche bestätigten einen Unterschied zwischen der Wirkung von Überständen von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42.

4. Diskussion

Die Zugabe von Überstand führte zu einer Verdünnung des Anzuchtmediums, sodass bei Zugabe einer 1:2 Verdünnung des Überstandes von *E. tasmaniensis* DS08 auch eine Reduzierung der gemessenen Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle vorlag. Ab einer Verdünnung von 1:4 war allerdings keine Hemmung mehr von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux zu beobachten. Die Verdünnung des Anzuchtmediums spielte offenbar eine entscheidende Rolle bei dem verminderten Wachstum des Pathogens. Dieser Effekt konnte bei einer Verdünnung des Mediums mit H₂O bestätigt werden (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu *E. tasmaniensis* DS08 zeigte die Zugabe des Kulturüberstandes von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auch in einer Verdünnung von 1:64 noch einen deutlichen Hemmeffekt auf *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux (um ca. 60%). Der Versuch bestätigte, dass die antagonistische Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 auf der Konkurrenz um die vorhandenen Nährstoffe beruht (Jakovljevic et al. 2008), während *B. amyloliquefaciens* FZB42 Toxine produziert, die eine Wirkung auf den Feuerbranderreger haben (Chen et al. 2009b). Die Ergebnisse zeigten außerdem, dass mit dem Ko-Kultivierungsassay die Wirkung von Antagonisten gegen *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux getestet werden kann. Ähnliches konnten Seibold et al. (2004) bei der Ko-Kultivierung von *E. amylovora* und verschiedenen Stämmen der Hefen *A. pullulans* und *M. pulcherrima* beobachten. Die Hemmung des Pathogens hing dabei von der Konzentration an synthetischem Nektar im Kulturmedium ab. Eine vergleichbare Wachstumshemmung des Pathogens, wie sie in den Ko-Kultivierungsversuchen beobachtet wurde, bestätigte sich im Freiland allerdings nicht. Untersuchungen zur Populationsdichte des Pathogens auf den Blüten behandelter und unbehandelter Bäume zeigten kaum einen Unterschied. Diese Beobachtung hebt die Wichtigkeit von Pflanzenversuchen noch einmal hervor.

4.2 Wirkung verschiedener Gram-positiver Organismen auf *E. amylovora*

Neben *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurden weitere Gram-positive Stämme auf ihre Hemmwirkung auf den Feuerbranderreger getestet. In Ko-Kultivierung zeigte auch *B. subtilis* eine deutliche Reduzierung der Lumineszenz von *E. amylovora* pfdC1-Z'-lux bei der Ko-Kultivierung. Bei einem Mischungsverhältnis von Antagonist zu Pathogen im Inokulum von 2:1 lag die maximale Lumineszenz zwischen 6% und 14% der Kontrolle. *B. subtilis* ist ein Bodenbakterium und kann sowohl das Pflanzenwachstum fördern, als auch hemmend auf Pflanzenpathogene wirken (Moszer 1998). Vertreter dieser Art werden gegen eine Vielzahl von Pathogenen als kommerzielle Biokontrollorganismen eingesetzt.

4. Diskussion

Dazu zählen pathogene Pilze wie *Aspergillus flavus*, *B. cinerea* oder *R. solani* (Pal & Mcspadden Gardener 2006), aber auch Bakterien aus den Gruppen *Pseudomonas*, *Xhantomonas* und *Erwinia* (Edgecomb & Manker 2006). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich außerdem, dass mit Kulturüberständen von verschiedenen Bazillen eine Hemmung von *E. amylovora* erzielt werden kann. In diesem Rahmen konnte auch gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Ernte dieser Überstände ein entscheidender Faktor in Bezug auf den Hemmeffekt ist. Kulturüberstände von *B. amyloliquefaciens* Stämmen, die nach einem oder zwei Tagen Inkubation bei 28°C geerntet wurden, zeigten beispielsweise nach einem Tag Kultivierung eine deutlich effektivere Hemmwirkung als nach zwei Tagen Kultivierung. Um unabhängig von der Entwicklung des Antagonisten agieren zu können, wäre der gezielte Einsatz von Toxinen in der Praxis denkbar.

4.3 Formulierung der Antagonisten zur praktischen Anwendung

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung eines Biokontrollorganismus zu einem Pflanzenschutzprodukt ist die Herstellung einer für den Verbraucher praktikabel anwendbaren Form (z.B. als Pulver oder Suspension). Eine praktikable Formulierung sollte nur einen minimalen Effekt auf die Antagonisten bezüglich seiner Lebensdauer, seiner Aktivität und seiner Wirksamkeit haben und das bei einer möglichst geringen Aufwandmenge. Die Formulierung von Gram-negativen Organismen gestaltet sich schwierig, da die Zellen häufig in ihrer Lagerstabilität eingeschränkt sind (Emmert & Handelsman 1999; Sallam et al. 2013). Zellen aus bisherigen Formulierungen von *E. tasmaniensis* DS08 zeigten ein deutlich langsames Wachstum und nach 24 h Inkubation kleinere Kolonien auf der Agarplatte als nicht-formulierte *E. tasmaniensis* DS08 Zellen (A. Wensing, persönliche Mitteilung). Der Projektpartner ABiTEP stellte für diese Arbeit ein Trockenprodukt von *E. tasmaniensis* DS08 mit einem Zuckerzusatz zur Verfügung. Die Aufzeichnung von Wachstumskurven mit einer Kultur aus formulierten Zellen als Inokulum im Vergleich zu einer Kultur mit einem Inokulum aus einer flüssigen Vorkultur zeigte, dass die Kultur mit formulierten Zellen eine verkürzte lag-Phase und eine höhere Wachstumsrate aufwies. Dies kann auf den Zuckerzusatz in der Formulierung zurückgeführt werden. Der Wachs-tums-ertrag zwischen beiden Kulturen war vergleichbar. Dieser Effekt war in Minimalme-dium besonders ausgeprägt. Neben der Reaktivierung der Zellen aus der Formulierung, wurde in dieser Arbeit auch die Haltbarkeit des Produktmusters von *E. tasmaniensis* DS08 untersucht. Diese war stark von der Lagerungstemperatur abhängig. Bei RT konnte *E. tasmaniensis* DS08 maximal einen Monat gelagert werden, bevor eine Abnahme der Lebendzellzahl beobachtet werden konnte.

4. Diskussion

Durch die Lagerung bei 4°C konnte die Stabilität der Lebendzellzahl auf 9 Monate erhöht werden. Dies ermöglicht für den Verbraucher die Lagerung des Antagonisten für eine Feuerbrandsaison, um bei Warndienstaufruf die Behandlung seiner Obstanlage durchzuführen. Um die Lebendzellzahl der formulierten *E. tasmaniensis* DS08 Zellen für einen längeren Zeitraum stabil zu halten, müssen die Zellen bei mindestens -20°C gelagert werden.

Bakterien der Gattung *Bacillus* haben eine Vielzahl an fungiziden und antibakteriellen Eigenschaften. Sie sind außerdem in der Lage mit Sporen stabile Dauerformen zu bilden, die problemlos gelagert werden können. *Bacillus* ist daher ein beliebter Biokontrollorganismus (Borriss 2011). Bei der Applikation von Sporenformulierungen liegen die Zellen allerdings in einer inaktiven Form vor. Um zu überprüfen, ob der Einsatz von Sporen zu einer verlängerten lag-Phase führt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstumskurven von *B. amyloliquefaciens* FZB42 verglichen. Als Inokulum wurden Zellen aus einer flüssigen Vorkultur bzw. aus der Sporenformulierung verwendet. Der Vergleich beider Kulturen zeigte keinen Unterschied im Wachstum, unabhängig von dem Einsatz eines Komplex- oder Minimalmediums. Der Wachstumsertrag war zwischen trockenformulierten Zellen und denen aus einer flüssigen Vorkultur ebenfalls vergleichbar. Entsprechend kann festgehalten werden, dass die Wachstumsfähigkeit des Antagonisten *B. amyloliquefaciens* FZB42 durch die Applikation von Sporen nicht eingeschränkt ist.

4.3.1 Einsatz von formulierten Toxinen

Sowohl *B. amyloliquefaciens* FZB2 als auch *P. polymyxa* bilden Toxine, die *in vitro* einen Hemmeffekt auf den Feuerbranderreger haben (Chen et al. 2009b; Niu et al. 2013). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nach der Kultivierung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux unter Zugabe von formulierten Kulturüberständen bestätigt werden. Es zeigten sich allerdings Unterschiede beim Einsatz verschiedener Konzentrationen der Formulierung. Die in dieser Arbeit verwendeten Formulierungen der Toxine enthielten getrocknete Kulturüberstände von *B. amyloliquefaciens* FZB42 bzw. *P. polymyxa* M1. Quantitativ konnte im Agar-Diffusionstest zunächst kein Unterschied in der Wirkung von *P. polymyxa* M1 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 Toxinen festgestellt werden. Im Kultivierungsassay zeigten die formulierten Toxine von *P. polymyxa* M1 auch in stärkeren Verdünnungen noch eine vollständige Hemmung von *E. amylovora* 1/79 pfdC1-Z'-lux, während die Toxine von *B. amyloliquefaciens* FZB42 keinen Effekt mehr erzielten.

4. Diskussion

Denkbar ist entweder, dass *P. polymyxa* M1 Toxine produziert, die eine bessere Wirkung auf den Feuerbranderreger haben als die von *B. amyloliquefaciens* FZB42 oder dass *P. polymyxa* M1 bei der Kultivierung mehr Toxin produziert als *B. amyloliquefaciens* FZB42 und dadurch auch bei höheren Verdünnungen der Formulierung noch genug Toxin für eine ausreichende Hemmung von *E. amylovora* vorhanden ist.

4.4 Wirkung der Antagonisten auf der Apfelblüte

4.4.1 Vergleich von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42

Für eine erfolgreiche Kontrolle des Feuerbranderregers ist die Entwicklung einer hohen Populationsdichte des Antagonisten auf der Blüte in kurzer Zeit von besonderer Bedeutung (Wilson et al. 1992). Bei der hier durchgeführten Sprühinokulation der Antagonisten auf Apfelblüten mit einer Suspension einer Konzentration von 1×10^8 cfu / ml lag die Zelldichte auf der einzelnen Blüte in einem Bereich von 1×10^5 bis 1×10^6 cfu. Bereits am dritten Tag wies *E. tasmaniensis* DS08 eine Population zwischen 1×10^8 bis 1×10^9 cfu / Blüte auf. In allen hier durchgeführten Versuchen war dies die maximale Zelldichte, die *E. tasmaniensis* DS08 auf der Blüte erreichte. Auch *E. amylovora* erreichte in den hier durchgeführten Blütenversuchen maximale Populationsdichten zwischen 1×10^8 bis 1×10^9 cfu / Blüte und lag damit im selben Bereich wie *E. tasmaniensis*. Aufgrund der Ähnlichkeit beider Organismen ist dies zu erwarten. Johnson et al. (2006) bestimmten in Oregon die Populationsdichte von *E. amylovora* auf dort heimischen Pflanzen nach der Inokulation mit 1×10^7 cfu / ml. Dort konnten auf Rosengewächsen (u.a. Apfel, Felsenbirne und Brombeere) nach vier Tagen Inkubation Zelldichten des Pathogens zwischen 1×10^6 und 1×10^8 cfu / Blüte nachweisen. Die maximalen Zelldichten von *E. amylovora* zwischen Blüten im Freiland und im Laborassay somit vergleichbar. Eine Reduzierung der maximalen Zelldichte von *E. amylovora* um einen Faktor 10 bis 100 nach der Behandlung mit *E. tasmaniensis* DS08 führte zu einer verminderten Symptomausbildung.

Im Gegensatz zu *E. tasmaniensis* und *E. amylovora* lag die in dieser Arbeit beobachtete höchste Besiedlungsdichte von *B. amyloliquefaciens* FZB42 bei ca. 1×10^5 bis 1×10^6 pro Blüte und damit ein bis zwei Größenordnungen niedriger als bei *E. tasmaniensis* DS08. Die Wirkungsgrade von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 schwankten im Blütenassay zwischen 50% bis 80% (*E. tasmaniensis* DS08), während der Wirkungsgrad von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zwischen 15% bis 50% lag. Die Etablierung geringerer Zelldichten von *B. amyloliquefaciens* FZB42 im Vergleich zu *E. tasmaniensis* DS08 könnte ein Grund für die geringere Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte sein.

4. Diskussion

In Bezug auf die lag-Phase nach der Applikation auf der Apfelblüte zeigte sich zwischen *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 kein Unterschied. Sowohl die formulierten *E. tasmaniensis* DS08 Zellen als auch die Sporenformulierungen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zeigten auf der Blüte eine lag-Phase von ca. 10 h. Auch die Dauer der exponentiellen Phase war zwischen den beiden Antagonisten vergleichbar. Ein Grund für die geringeren Zelldichten von *B. amyloliquefaciens* FZB42 könnte eine verringerte Aktivität der applizierten Sporen sein. In einem weiteren Versuch wurde der Anteil von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen auf der Blüte bestimmt. Wie erwartet lag der Sporenanteil direkt nach der Applikation der Sporenformulierung bei 100% in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Bereits nach 12 h konnte ein erhöhter Anteil vegetativer Zellen bestimmt werden und nach 24 h lagen fast 80% der *B. amyloliquefaciens* FZB42 Zellen auf der Blüte als vegetative Zellen vor. Diese Beobachtung zeigte, dass die Sporen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 innerhalb der ersten 24 h auf der Apfelblüte auskeimen. Bereits nach 36 h wurde allerdings eine Zunahme des Sporenanteils beobachtet und nach 60 h lagen fast 100% der FZB42 Zellen auf der Blüte als Spore vor. In diesem Zeitraum war auch nur eine geringe Zunahme der cfu zu beobachten. Anscheinend sind die vorhandenen Bedingungen auf der Blüte nicht ausreichend für ein länger anhaltendes Wachstum von *B. amyloliquefaciens* FZB42. Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte etwas weniger als 36 h als Antagonist aktiv ist. Dieser Zeitraum ist im Vergleich zu der schnellen Entwicklung von *E. amylovora* relativ kurz und schränkt den Schutz von später infizierten Blüten deutlich ein. Eine Ursache für die frühe Sporenbildung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 auf der Blüte könnte ein begrenztes Angebot an Nährstoffen für das vegetative Wachstum sein. Nährstoffmangel ist ein entscheidender Faktor bei der Induktion der Sporenbildung in *Bacillus* (Errington 1993). Möglicherweise verbraucht *B. amyloliquefaciens* FZB42 die auf der Blüte vorhandenen Nährstoffe schneller als beispielsweise *E. tasmaniensis*. Um eine längere Aktivität und höhere Zelldichten von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Zellen auf der Blüte zu erreichen, wurde in dieser Arbeit versucht, das Wachstum des Antagonisten durch Zugabe von Nährstoffen zu fördern. Dabei wurde nach Komponenten gesucht, die der Feuerbranderreger nicht verwertet. Dazu zählten zum einen Stärke und zum anderen das Additiv B2, das von der ABiTEP GmbH zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Applikation von *B. amyloliquefaciens* FZB42 mit dem jeweiligen Nährstoffzusatz konnte bei der Entwicklung im Blütenassay kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ohne Nährstoffzusatz festgestellt werden.

4. Diskussion

Die maximalen Zelldichten lagen wie in den vorherigen Versuchen zwischen 1×10^5 und 1×10^6 cfu / Blüte. Ob die Nährstoffzugabe einen Einfluss auf die Sporenbildung der Zellen nach der Applikation nimmt, soll in künftigen Studien näher untersucht werden.

Im Gegensatz zu den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten ließ sich auf der Blüte kaum eine Wirkung mit den Toxinen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *P. polymyxa* M1 erzielen. Wenngleich die Lagerung der formulierten Toxine selbst bei RT bis zu zwei Jahre ohne Wirkungsverlust möglich war (nicht gezeigt), kann die Stabilität oder die Haftung auf der Blüte eingeschränkt sein. Da es sich bei *B. amyloliquefaciens* FZB42 um ein Bodenbakterium handelt (vgl. Kapitel 1.3.1.2), sind die Zellen auf der Blüte beispielsweise UV-Strahlung ausgesetzt. Dies könnte auch einen Einfluss auf die Stabilität der Toxine nehmen. Es ist noch nicht geklärt, inwieweit die Synthese von Toxinen beim Wachstum auf der Blüte induziert wird. Chen et al. (2009b) zeigten, dass *B. amyloliquefaciens* FZB42 Mutanten, in denen die Synthese einzelner Toxine gezielt ausgeschaltet war, auf der Blüte vergleichbare Wirkungen gegen *E. amylovora* erreichten wie der *B. amyloliquefaciens* FZB42 Wildtyp. Ebenso wie sich die Effektivität der Toxine von *P. polymyxa* M1 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 unterscheiden, könnten Toxine anderer Organismen eine höhere Stabilität auf der Blüte aufweisen.

Die Behandlung von Blüten mit einer Kombination aus *B. amyloliquefaciens* FZB42 Sporen und Toxinen von *P. polymyxa* M1 zeigte hingegen einen sehr guten Effekt auf den Feuerbranderreger mit einem Wirkungsgrad von über 80%. Es ist denkbar, dass die Toxine direkt nach der Applikation auf der Blüte noch einen toxischen Effekt auf das Pathogen ausüben können und so das Inokulum des Erregers reduzieren. Der größere Zeitabstand zwischen Applikation der Toxine und der sekundären Infektion im Freiland kann eine Erklärung für die vergleichbare Wirkung zwischen den Behandlungsvarianten Ba FZB42 und Ba FZB42+ im Freilandversuch sein (vgl. Tabelle 23). Um potentielle Kandidaten für einen Biokontrollorganismus im Bereich Feuerbrand zu selektieren, sind im Vorfeld umfangreiche Untersuchungen erforderlich, um Aspekte wie Wirkungsmechanismen, Wachstum oder Einfluss von Umweltfaktoren abzuklären. Dies ist vor allem aufgrund der geringen Kapazitäten die für Freilandversuche zur Verfügung stehen ein wichtiger Aspekt.

4.4.2 Wirkung der Antagonisten unter Freilandbedingungen

Eine Feuerbrandinfektion ist stark abhängig von den Witterungsbedingungen (Van Der Zwet & Keil 1979). Dies zeigte sich auch in den schwankenden Befallsstärken der hier durchgeführten Freilandversuche. 2013 wurden 24% Sekundärbefall in der unbehandelten Kontrolle erreicht.

4. Diskussion

Die Bedingungen für den Feuerbrand waren in dem Jahr günstig, da nach der Inokulation mehrere Tage recht hohe Tagesdurchschnittstemperaturen von 14°C bis 16°C herrschten. Von den getesteten Antagonisten erreichte *E. tasmaniensis* DS08 im ersten Versuchsjahr einen Wirkungsgrad von 57%. *B. amyloliquefaciens* FZB42 zeigte mit unter 20% nur eine sehr schwache Wirkung. Dies bestätigte die im Labor beobachtete bessere Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08.

2014 wurde für beide Antagonisten versucht, den Wirkungsgrad über die Zugabe von verschiedenen Additiven zu verbessern. Getestet wurden Nährstoffzusätze für die spezifische Förderung des Wachstum der Antagonisten, Netzmittel für eine verbesserte Benetzung und Verteilung der applizierten Zellen auf der Pflanzenoberfläche sowie UV-absorbierende Agenzien zum Schutz der Antagonisten vor Strahlung. Die Zugabe von Additiven konnte bereits bei verschiedenen Biokontrollorganismen zu einer höheren Effektivität gegenüber Pathogenen führen. Ibrahim & Rossall (2001) zeigten in Bioassays mit Tomatensämlingen, dass ein Nährstoffzusatz in Form von Hefeextrakt die Biokontrollwirkung von *Pseudomonas cepacia* gegen *Fusarium oxysporum* verbessern kann. Die Zugabe von 2-Deoxy-Glucose führte zu einer effektiveren Biokontrolle bei Nachernteerkrankungen durch *Penicillium expansum* auf Früchten von *Malus*, *Pyrus* und *Citrus* (Janisiewicz 1994; El Ghaouth et al. 2000). Eine ebenfalls verbesserte Wirkung konnte sowohl bei Hefepräparaten (*Candida saitoana*) als auch bei dem bakteriellen Antagonisten *P. syringae* beobachtet werden.

Die Witterungsbedingungen waren 2014 für den Feuerbrand zum ersten Inokulationstermin mit einer Tagesdurchschnittstemperatur von 12°C bis 15°C günstig, danach kühlte es allerdings deutlich ab (Tagesdurchschnittstemperatur ca. 7°C) und es trat sogar Frost auf. Im Versuch führte dies zu einem niedrigen Sekundärbefall von knapp über 5% in der unbehandelten Kontrolle. *E. tasmaniensis* DS08 erreichte im Versuch 2014 ohne Additive einen Wirkungsgrad von 65%. Entgegen der eigentlichen Erwartung schnitt der Additivan-satz mit UV-Schutz, Nährstoffen und Netzmittel mit 40% Wirkungsgrad im Mittel schlechter ab als die Variante ohne Additive, zeigte aber auch eine größere Schwankung von ca. 20%. Die Zugabe der Additive (Netzmittel, Nährstoffe, UV-Schutz) konnte demnach keine Verbesserung bei der Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 bewirken. Im Gegensatz zu *E. tasmaniensis* DS08 konnte die Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 durch die Additive (UV-Schutz, Nährstoffe, Netzmittel und Toxine von *P. polymyxa* M1) deutlich verbessert werden (ca. 40% höher als ohne Additive).

4. Diskussion

2015 wurden die Antagonisten in den gleichen Varianten wie 2014 getestet, abgesehen von zwei Änderungen. Auf das ihm Vorjahr bei *E. tasmaniensis* DS08 eingesetzte Netzmittel wurde in der Additiv-Variante verzichtet. In den beiden Behandlungsvarianten von *B. amyloliquefaciens* FZB42 wurden zusätzlich Nährstoffe zugesetzt. Die Witterungsbedingungen im Jahr 2015 waren die ersten zwei Tage nach dem ersten Behandlungs- und Inokulationstermin warm und somit vorteilhaft für die Entwicklung des Feuerbranderreger. Danach kühlte es allerdings deutlich ab. Fünf Tage nach der zweiten Behandlung und Inokulation wurde es wieder wärmer und die Tagesdurchschnittstemperaturen waren mit denen nach dem ersten Behandlungs- und Inokulationstermin vergleichbar. In der unbehandelten Kontrolle konnte trotz der eher ungünstigen Witterungsbedingungen ein Sekundärbefall von 36% erzielt werden. Die beiden *E. tasmaniensis* DS08 Varianten schnitten gleich gut ab (ca. 63% Wirkungsgrad), was darauf schließen lässt, dass a) vermutlich das Netzmittel für die reduzierte mittlere Wirkung 2014 verantwortlich war und b) die übrigen Additive keine entscheidende Verbesserung bewirkten. Bei *B. amyloliquefaciens* FZB42 lag der Wirkungsgrad in beiden Behandlungsvarianten bei ca. 46%. Die Ansätze unterschieden sich insofern voneinander, dass in der Additiv-Variante UV-Schutz, Netzmittel und *P. polymyxa* M1 Toxine zugefügt wurden. Die zusätzlichen Nährstoffe wurden beiden Formulierungen zugegeben. Die gleichen Wirkungsgrade beider Varianten lassen vermuten, dass die Nährstoffe ein wichtiger Faktor für die verbesserte Wirkung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 waren. Für eine abschließende Beurteilung müssen allerdings noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Trotz der Schwankungen im Befall der unbehandelten Kontrolle in den drei Versuchsjahren lag der Wirkungsgrad des Antagonisten *E. tasmaniensis* DS08 konstant bei ca. 60% und damit in einem mittleren Wirkungsbereich im Vergleich zu den Kontrollen Streptomycin (79% bis 85%) und LMA (52% bis 70%). Auffällig ist dabei, dass *E. tasmaniensis* DS08 trotz des hohen Befalls in 2015 (36% in unbehandelt) eine vergleichbare Wirkung zeigte wie in den Vorjahren. Mit einem Wirkungsgrad von 61% konnte der Antagonist sogar eine bessere Wirkung als LMA erzielen (52% Wirkungsgrad). Eine Erklärung für die bessere Wirkung des Antagonisten könnte in diesem Fall der Zeitabstand zwischen den beiden Behandlungsterminen sein. Während üblicherweise zwischen den beiden Behandlungen zwei bis drei Tage Abstand liegen, betrug der Abstand 2015 aufgrund des kühlen Wetters fünf Tage. In diesem Zeitraum war *E. amylovora* offensichtlich trotz der nicht optimalen Bedingungen in der Lage sich ausreichend zu entwickeln.

4. Diskussion

Die Hemmung durch *E. tasmaniensis* DS08 könnte durch die Verteilung in der Anlage auf noch unbehandelte Blüten über natürliche Vektoren, wie sie auch von Nucló et al. (1998) für die Feuerbrandantagonisten *P. fluorescens* A506 und *P. agglomerans* C9-1S beschrieben wurde, im Vergleich zu LMA begünstigt worden sein.

Der maximal erreichte Wirkungsgrad von *B. amyloliquefaciens* FZB42 lag in den hier durchgeführten Freilandversuchen bei ca. 45% und damit deutlich geringer als *E. tasmaniensis* DS08. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den vorangegangenen Blütenversuchen im Labor. Während im ersten Versuchsjahr mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 kaum eine Wirkung gegen den Feuerbranderreger erzielt werden konnte, brachte die Zugabe von Additiven zur Formulierung sowohl 2014 als auch 2015 eine Verbesserung des Wirkungsgrades. Höchstwahrscheinlich bedingt durch den Nährstoffzusatz. Im Apfelblütenassay unter Laborbedingungen wurde durch die Applikation von zusätzlichen Nährstoffen keine Wachstumsförderung von *B. amyloliquefaciens* FZB42 erreicht. Es ist jedoch denkbar, dass die Additive unter extremeren Bedingungen im Freiland das Wachstum des Antagonisten fördern. Im Vergleich zu Blüten aus dem Gewächshaus ist es ebenfalls möglich, dass die Blüten im Freiland mit einer größeren Anzahl an Epiphyten besiedelt sind, was zu einem reduzierten Nährstoffangebot für den applizierten Antagonisten führen könnte. Dieser Effekt könnte durch das zugegebene Additiv aufgehoben worden sein.

Auffällig war in allen Freilandversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, dass zwischen den einzelnen Parzellen der jeweiligen Behandlung starke Schwankungen auftraten. Bei *E. tasmaniensis* DS08 schwankten die Wirkungsgrade deutlich in den einzelnen Parzellen. 2013 lag der Wirkungsgrad in vier Wiederholungen zwischen minimal 42% bis maximal 77% (nicht gezeigt). 2014 konnten Wirkungsgrade zwischen 56% und 82% beobachtet werden (nicht gezeigt), 2015 lag der Schwankungsbereich zwischen 51% und 76% (Abbildung 34). Eine noch deutlichere Schwankung war bei der *E. tasmaniensis* DS08 Variante mit Additiven zu beobachten. 2014 wurden Nährstoffe, Netzmittel und UV-Schutz mit dem Antagonisten appliziert. In zwei Parzellen konnten Wirkungsgrade von 56% und 66% erreicht werden, in zwei Parzellen lag der Wirkungsgrad jedoch deutlich geringer bei 14% und 26%. Es ist denkbar, dass das Netzmittel eher ein Abwaschen der Zellen durch Niederschlag begünstigte, als die Anheftung auf der Blüte. 2015 wurde auf das Netzmittel in der Additiv-Variante verzichtet und die Schwankung war deutlich geringer. Der minimale Wirkungsgrad der vier Parzellen lag bei 60%, der maximale Wirkungsgrad betrug 67%.

4. Diskussion

Bei *B. amyloliquifaciens* FZB42 konnten ebenfalls deutliche Schwankungen in den einzelnen Parzellen beobachtet werden. 2014 konnte beispielsweise in zwei Parzellen keine Wirkung nachgewiesen werden, in den anderen beiden lag der Wirkungsgrad bei 17% und 30%. Die Additiv-Variante (mit Nährstoffen, Netzmitteln, UV-Schutz und *P. polymyxa* Toxinen) wies in den einzelnen Parzellen einen Wirkungsgrad von 36%, 45%, 57% und 58% auf (nicht gezeigt). 2015 wurden beide Behandlungsvarianten von *B. amyloliquifaciens* FZB42 mit Nährstoffzusatz appliziert. Der mittlere Wirkungsgrad lag bei beiden Varianten bei ca. 50%. Die Wirkungsgrade in den einzelnen Parzellen waren zwischen beiden Behandlungsvarianten vergleichbar und lagen zwischen minimal 32% (Ba FZB42) bzw. 36% (Ba FZB42+) und maximal 54% (Ba FZB42) und 58% (Ba FZB42+). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in vorherigen Versuchsjahren mit anderen Behandlungsvarianten gemacht werden (A. Wensing, persönliche Mitteilung). Auch im Befall treten Schwankungen zwischen einzelnen Parzellen auf (siehe auch Abbildung 33). Diese sind daher dem Versuchsaufbau geschuldet und dem Einfluss von äußeren Faktoren wie z.B. Blütenzustand und Insektenflug. Die Wirkungsgrade in einzelnen Parzellen zeigen jedoch, dass für beide Antagonisten bei den vorliegenden Bedingungen Wirkungsgrade von bis zu 82% (Et DS08) und 58% (Ba FZB42+) möglich waren. Die beobachteten Schwankungen zwischen den einzelnen Parzellen eines Versuches erschweren die abschließende Bewertung der Antagonisten, solange der Grund dafür nicht geklärt ist. Aktuell kann nicht gesagt werden, wodurch die schlechtere Wirkung von *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquifaciens* FZB42 in einzelnen Parzellen zustande kommt. Eine Möglichkeit wäre, dass der Antagonist in einzelnen Fällen nicht effektiv genug gegen den Feuerbrand-erreger ist (z.B. aufgrund höherer Erregerdichten auf einzelnen Blüten) oder ob an Bäumen, in denen nur ein schwacher Wirkungsgrad beobachtet werden konnte kein Antagonist auf der Blüte vorhanden war (z.B. durch verminderte Verbreitung auf Blüten, die zum Zeitpunkt der Behandlung geschlossen waren). Diese Frage muss geklärt werden, um Lösungsansätze zu finden, die für eine zuverlässigere Wirkung der Antagonisten im Freiland führen.

4.4.2.1 Antagonistische Aktivität von *Bacillus* in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor für das Wachstum von Bakterien und spielt bei der Feuerbrandinfektion eine entscheidende Rolle (Shwartz et al. 2003). Im Freiland schwanken die Temperaturen und können im Frühjahr, wenn die Feuerbrandgefahr am größten ist in einem Bereich liegen, die für die Feuerbrandantagonisten suboptimal sein können. Das Pathogen *E. amylovora* hat bei 28°C sein Temperaturoptimum.

4. Diskussion

Bereits bei Temperaturen unter 21°C konnte ein langsames Wachstum des Pathogens beobachtet werden. So liegt die Verdopplungszeit von *E. amylovora* bei 28°C bei ca. 1,4 h, während sie bei 18°C bereits auf 2,76 h ansteigt (Shrestha et al. 2005). Im Vergleich dazu liegt das Optimum von *B. amyloliquifaciens* FZB42 etwas höher zwischen 30°C und 40°C. Unter 15°C kann bei diesem Bakterium kaum Wachstum beobachtet werden (Priest et al. 1987). Landa et al. (2004) wiesen nach, dass die Unterdrückung von Pathogenen durch Rhizobakterien mit der Bodentemperatur zusammenhängen und De Curtis et al. (2012) zeigten, dass die Effektivität von Biokontrollorganismen gegen *Aspergillus carbonarius* mit der Temperatur und der relativen Luftfeuchte zusammenhängt. In dieser Arbeit wurde die Hemmung von *E. amylovora* durch *B. amyloliquifaciens* FZB42 bei niedriger Temperatur mit denen von thermotoleranteren Antagonisten verglichen, bei denen ein Wachstum zwischen 4°C – 10°C möglich ist.

B. pumilus ist in der Lage, *C. beticola* auf Zuckerrüben zu unterdrücken (Bargabus et al. 2004). *B. atrophaeus* zeigt eine Hemmwirkung auf *B. cinerea*, bei der Lipopeptide, sekretierte Proteine und flüchtige Verbindungen zur antagonistischen Aktivität beitragen (Zhang et al. 2013). Bei der Ko-Kultivierung bei einer Temperatur von 16°C zeigte sich deutlich, dass auch die Hemmwirkung der thermotoleranteren *Bacillus* Arten im Vergleich zu einer Kultivierung bei 28°C deutlich eingeschränkt war. Lediglich bei einem 2,5-fachen Überschuss an Antagonist im Inokulum wurde in der Ko-Kultur noch eine Hemmwirkung von bis zu 60% durch *B. pumilus* N6 erreicht. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:1,6 (Antagonist zu Pathogen) im Inokulum lag die maximale Hemmung durch *B. pumilus* N6 bei ca. 20%. Im Vergleich konnten sowohl *B. amyloliquifaciens* FZB42, *B. atrophaeus* GBSC56 als auch *B. pumilus* N6 bei 28°C den Feuerbranderreger selbst bei einem 1,6-fachen Überschuss des Pathogens im Inokulum *E. amylovora* bis zu 90% hemmen. Dies verdeutlicht, wie wichtig das optimale Wachstum des Antagonisten für eine Hemmung von *E. amylovora* ist. Eine Ausnahme bei den hier durchgeführten Versuchen bildete *B. simplex* R41 bei dem die Hemmwirkung von ca. 50% unabhängig von der Inkubationstemperatur war und nur minimal von den Inokulumgemisch in der Ko-Kultur beeinflusst wurde. Der Einsatz von Kulturüberständen gewonnen unter kälteren Bedingungen und die Überprüfung der erzielten Hemmwirkung, könnten Aufschluss darüber geben, inwieweit die Synthese von Toxinen zumindest *in vitro* von der Temperatur beeinflusst wird und eine Rolle bei der verminderten Hemmung von *E. amylovora* spielt.

4.5 Detektion von Antagonisten im Freiland und Bezug zu erzielten Wirkungsgraden im Feldversuch

Die Etablierung des Antagonisten auf der Blüte ist ein essentieller Faktor bei der Hemmung von *E. amylovora*. Um die Verbreitung der Antagonisten in der Versuchsanlage in Kirschgartshausen zu untersuchen, wurden über die Blütezeit unbehandelte und behandelte Blüten gesammelt und der Anteil an Proben bestimmt, in denen der ausgebrachte Antagonist nachgewiesen werden konnte. Der in dieser Arbeit durchgeführte Nachweis von *E. tasmaniensis* aus Freilandproben via PCR war stark abhängig von der Aufarbeitung der Template DNA. Die Detektion des Antagonisten aus der Waschprobe zeigte in der Regel weniger positive Nachweise als die Ergebnisse nach der Bio-PCR. Dies hängt höchstwahrscheinlich mit PCR-Inhibitoren in der Waschprobe zusammen. Guest & Brown (1997) zeigten, dass die Synthese von Phytoanticipinen und Phytoalexinen ein wichtiger Teil des pflanzlichen Immunsystems ist und diese in allen Bereichen der Pflanze gebildet werden können. Die Zusammensetzung kann dabei zwischen den Organen variieren. Chizzali et al. (2012) konnten zeigen, dass durch die Infektion von Apfel- und Birntrieben mit dem Feuerbranderreger *E. amylovora* die Produktion von Phytoalexinen induziert wird und es im Rahmen dessen z. B. zu einer Akkumulation von Biphenylen und Dibenzofuranen in dem Übergangsbereich von gesunden zu infizierten Gewebe kommt. Diese Substanzen können einen inhibitorischen Effekt auf die PCR-Reaktion haben und so zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Wilson 1997). Durch Verdünnung der Proben können solche Störfaktoren ausreichend reduziert werden, allerdings geht dies auch mit einer Verdünnung der Template DNA einher. Die DNA Konzentration in der Probe könnte dadurch unterhalb der Nachweisgrenze liegen (Samarakoon et al. 2013). Dies deckte sich mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bei der Detektion von *E. tasmaniensis* DNA aus den Waschproben. Eine höhere Verdünnung ermöglichte in einigen Fällen einen positiven Nachweis des Antagonisten (nicht gezeigt). Aufgrund der Inhomogenität der einzelnen Proben konnte allerdings keine einheitliche Verdünnungsstufe für alle Proben festgelegt werden. Die Verdünnung war stark von der jeweiligen Probe abhängig. Aufgrund des großen Probenumfangs von bis zu 50 Proben pro Zeitpunkt war das Testen verschiedener Verdünnungen der einzelnen Proben nicht praktikabel durchführbar. Gleiches gilt auch für eine Aufreinigung der Proben vor der DNA-Amplifikation, zum Beispiel durch Phenol-Chloroform Extraktion oder Proteinase K Behandlung (Schrader et al. 2012).

4. Diskussion

Schaad et al. (1995) veröffentlichten eine Methode bei der Bakterien aus Bohnensamen-Extrakten vor der PCR kultiviert wurden. Dazu wurden die Zellen zunächst auf Agarplatten angezogen und anschließend abgewaschen. Auf diese Weise konnte das Pathogen *P. syringae* pv. *phaseolicola* ohne aufwendige Vorbehandlung der DNA verlässlich detektiert werden. Diese BIO-PCR wurde auch bei anderen Organismen wie *Erwinia carotovora* susp. *atroseptica* und *Clavibacter michiganensis* susp. *sepedonicus* angewendet (Hyman et al. 1997; Schaad et al. 1999). Durch die Kultivierung der Zellen wird neben der Verdünnung der inhibitorischen Komponenten eine höhere Konzentration an Template DNA sowie die spezifische Detektion lebender Zellen erreicht. Gerade die Detektion von Pathogenen spielt häufig eine Rolle bei der Entscheidung, ob bestimmte phytosanitäre Maßnahmen oder Pflanzenschutzbehandlungen angewendet werden. Die Detektion von toten Zellen oder frei zugänglicher DNA kann diesbezüglich zu Ergebnissen führen, die möglicherweise unnötige Behandlungen zur Folge haben, da kein akutes Infektionsrisiko besteht. Durch die Zwischenkultivierung lässt sich allerdings kein Rückschluss auf die reale Zelldichte auf der Blüte ziehen. Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass die Kultivierung zeitaufwendiger ist als die direkte PCR (Schaad et al. 1995; Schaad et al. 1999).

Taylor et al. (2001) nutzen den zusätzlichen Kultivierungsschritt um *E. amylovora* in Gegenwart von Pflanzengewebe und von Apfelblüten zu detektieren. Auch sie konnten eine höhere Zuverlässigkeit und Sensitivität des Nachweises durch die Anreicherung der Zellen beobachten. Der hier beobachtete Nachweis von *E. tasmaniensis* auf unbehandelten Blüten bestätigte eine Verteilung des Organismus über natürliche Vektoren innerhalb der Anlage, wie sie Nuclio et al. (1998) auch bei den Feuerbrandantagonisten *P. fluorescens* A506 und *P. agglomerans* C9-1S zeigen konnten. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass beispielsweise auch Blüten, die zum Zeitpunkt der Behandlung noch geschlossen waren, vor einer Infektion geschützt werden können. In dem hier durchgeführten Feldversuch wurde bei den behandelten Bäumen der Antagonist zu einem sehr hohen Anteil von bis zu 100% in den Proben detektiert, wobei der Anteil positiver Proben auch im Verlauf der Versuche variierte. Im Versuch 2014 fiel der Anteil positiver Proben zum Zeitpunkt t2 beispielsweise auf 0%, stieg aber bereits eine Woche später bereits wieder auf 70% positive Proben. Ein vollständiger Verlust Antagonist in der Anlage ist unwahrscheinlich, da sowohl Antagonist als auch Pathogen zu nachfolgenden Zeitpunkten wieder detektiert werden konnten. Es ist allerdings durchaus möglich, dass eine starke Reduktion der Zellzahlen stattgefunden hat und somit die Nachweisdichte geringer war.

4. Diskussion

Möglicherweise hängt die verminderte Detektion mit den stark abfallenden Temperaturen über den Versuchszeitraum zusammen, in dem sogar die Frostschutzberechnung in der Anlage eingesetzt werden musste, um die Blüten vor Frostschäden zu schützen. Es ist durchaus denkbar, dass durch den Frost die Zellen auf einzelnen Blüten abgestorben sind. Der gleiche Abfall konnte auch bei der Detektion von *E. amylovora* beobachtet werden (nicht gezeigt).

Auch 2015 konnte eine deutliche Reduktion der positiven *E. tasmaniensis* Nachweise beobachtet werden. Während zum Zeitpunkt t2 in 80% (DS08) bis 100% (DS08+) der Proben *E. tasmaniensis* nachgewiesen werden konnte, waren zum Zeitpunkt t3 20% (DS08) bis 50% der Proben positiv. Ein Zusammenhang mit einem Ereignis wie der Frostschutzberechnung in 2014 ließ sich 2015 nicht erkennen. Dies verdeutlicht die Schwankung, die innerhalb der einzelnen Blütenproben auftritt. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Detektion von *E. tasmaniensis* konnte die Etablierung des Antagonisten auf der Blüte über den Versuchszeitraum bestätigt werden. Eine Korrelation zwischen der Detektion des Antagonisten und dem Wirkungsgrad im Bekämpfungsversuch konnte nicht beobachtet werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung und Detektion in einem analogen Parallelversuch nähert sich zwar den Bedingungen an, die Kapazitäten an Blüten für den Versuch sind allerdings limitiert. Dazu kommt ein hoher Arbeitsaufwand bei der Behandlung, der Probennahme und der Aufarbeitung der einzelnen Blüten im Labor. Dass die Blüten aus dem Bekämpfungsversuch nicht entnommen verwendet werden können, erschwert die Bewertung zusätzlich.

Für den Nachweis von *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif im Freiland wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz getestet. Die Blütenwaschproben wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und die Menge an *Bacillus* über die cfu / Blüte bestimmt. Dies ermöglichte nicht nur den Nachweis des Antagonisten, sondern gab auch Aufschluss auf die realen Zelldichten von *Bacillus* auf der Blüte. Der Vergleich von unbehandelten und mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 Rif behandelten Blüten zeigte, wie erwartet, einen deutlich höheren *Bacillus* Anteil nach der Behandlung und Zelldichten von bis zu 1×10^5 cfu / Blüte. Vier Wochen nach der Behandlung mit *B. amyloliquefaciens* FZB42 nahmen die *Bacillus* Zelldichten ab. Bei der Behandlungsvariante ohne Additive lag zum Versuchsende in 70% der Proben eine maximale cfu von 1×10^2 pro Blüte vor. Die Zelldichten der Additiv-Variante zeigten hingegen zu demselben Zeitpunkt noch in 50% der Proben eine maximale *Bacillus* cfu von 1×10^4 pro Blüte.

4. Diskussion

Die Additive könnten demnach einen positiven Effekt auf die Erhaltung höherer Zelldichten über einen längeren Zeitraum haben. Nichtsdestotrotz lag der Wirkungsgrad bei beiden Behandlungsvarianten bei ca. 50%. Eine Korrelation zwischen dem Wirkungsgrad und der Detektion des Antagonisten konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Die maximal detektierte Zelldichte im Freiland lag bei ca. 1×10^5 cfu / Blüte. Dieser Wert ist mit den im Labor durchgeführten Blütenassays vergleichbar, trotz der Applikation von Nährstoffzusätzen in beiden Behandlungsvarianten. Ein Vergleich der Zelldichten mit einer Behandlungsvariante ohne Nährstoffzusätze könnte Aufschluss darüber geben, ob die maximale Zelldichte im Freiland ohne Additive unterhalb 1×10^5 liegt.

4.6 Der Einfluss einer Mutation in *ymoB* auf die Eigenschaften des Antagonisten *E. tasmaniensis*

Eine Reihe Faktoren spielen beim bakteriellen Wachstum auf der Blüte eine Rolle. Adhäsion an der Oberfläche und UV-Schutz durch starke Sonneneinstrahlung sind zwei Beispiele, die einem Organismus einen Vorteil bei der Besiedelung der Phyllosphäre bieten können (Lindow & Brandl 2003).

Eine Transposonmutante von *E. tasmaniensis* 1/99 (Tn5_No. 5) zeigt diesbezüglich zwei Unterschiede zu ihrem Wildtyp. Zum einen weisen die Kolonien eine gelbe Pigmentierung auf. Arrage et al. (1993) konnten zeigen, dass pigmentierte Bakterien aus Untergrundproben resistenter gegenüber UV-Strahlung sind als nicht-pigmentierte. Bei Gram-negativen Pflanzenpathogenen wie *P. stewartii* subsp. *stewartii* konnte ebenfalls ein entsprechender Zusammenhang beobachtet werden (Mohammadi et al. 2012). Zum anderen weist die Tn5_No. 5 Mutante eine verstärkte Adhäsion auf. Dies äußert sich in Flüssigkultur bei der Bildung einer Kahmhaut auf der Oberfläche des Kultivierungsmediums. Adhäsion ist ein wichtiger Aspekt bei der Kolonisierung von Pflanzenoberflächen und stellt den ersten Schritt bei der Bildung einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft in Form von Biofilmen dar (Danhorn & Fuqua 2007). Sowohl Pflanzenpathogene wie *Ralstonia solanacearum* und *X. campestris* als auch nicht-pathogene Arten wie *Rhizobium leguminosarum* und *Bradyrhizobium japonicum* bilden auf der Pflanze Biofilme und können sich auf diese Weise vor diversen äußeren Faktoren wie antimikrobiellen Substanzen, Austrocknung, UV-Strahlung oder osmotischem Stress schützen (Davey & O'toole G 2000; Bogino et al. 2013). Bais et al. (2004) zeigten außerdem, dass die Biokontrolleffektivität von *B. subtilis* M1 gegen *P. syringae* mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung zusammenhängt.

4. Diskussion

Das Transposon in der Tn5_No. 5 Mutante liegt im Gen *ymoB*, dessen Funktion in *E. tasmaniensis* noch nicht geklärt ist. Die Aminosäuresequenz von YmoB weist eine 66% Sequenzidentität mit YmoB aus *Yersinia enterocolitica* auf. Beide Proteine besitzen eine konservierte Domäne, die der YbaJ Familie zugeordnet wird. Diese spielt eine Rolle bei der Regulation der Biofilmbindung z. B. in *E. coli* K12 (Barrios et al. 2006). In *E. tasmaniensis* liegt *ymoB* gemeinsam mit *ymoA* auf einem Operon. Das Genprodukt YmoA weist in seiner Aminosäuresequenz eine 82%-ige Identität zu YmoA in *Y. enterocolitica* auf. Eine hochkonservierte Domäne des Proteins ist homolog zur Familie der Hha Proteine. Unter bestimmten Bedingungen kann *ymoA* aus *Y. enterocolitica* *hha*-negative Mutanten von *E. coli* komplementieren (Balsabore et al. 1996). Proteine der Hha/YmoA Familie spielen eine Rolle bei der thermoregulatorischen Expression von Virulenzfaktoren (Madrid et al. 2001). Dabei spielt die Interaktion mit einer anderen Gruppe an Regulationsproteinen, den *histone-like nucleoid structure* (H-NS) Proteinen eine wichtige Rolle. Sowohl Hha aus *E. coli* als auch YmoA aus *Y. enterocolitica* sind in der Lage einen Komplex mit H-NS zu bilden (Nieto et al. 2002). Diese Proteine haben eine Funktion bei der Regulation der Genexpression von Virulenzfaktoren wie z. B. der Expression von Hämolyysin in *E. coli* (Nieto et al. 1991). Jackson et al. (2004) zeigten, dass die thermoregulierete Expression des für die Virulenz essentiellen T3SS in *Y. pestis* mit der Proteolyse von YmoA bei 37°C zusammenhängt.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob sich der Phänotyp der Tn5_No. 5 Mutante über heterologe Expression komplementieren lässt. Dabei zeigte sich, dass *ymoB* aus *E. tasmaniensis* nicht ausreicht, um den Phänotyp der Mutante zu komplementieren. Dies war lediglich mit dem kompletten *ymoBA* Operon oder mit *ymoA* möglich. Daraus kann geschlossen werden, dass *ymoA* eine Rolle bei der Ausbildung dieses Tn5_No. 5 Phänotyps spielt. Die Mutation in *ymoB* scheint einen Einfluss auf *ymoA* zu haben. Die Beobachtung eines polaren Effekts durch eine Tn5 Mutation in *ymoB* konnten Ellison et al. (2003) auch in *Y. enterocolitica* nachweisen. Dort wurde mit einer chromosomalen *lacZ-ymoA* Fusion die Promotoraktivität mittels β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Diese war in der *ymoB* Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Um die Funktionalität von *ymoBA* zwischen dem nicht-pathogenen Organismus *E. tasmaniensis* und dem Feuerbranderreger *E. amylovora* zu vergleichen, wurden überprüft, ob sich die Tn5_Mutante auch mit dem artfremden Gen komplementieren lässt. Die Beobachtungen bestätigten einen derartigen Zusammenhang und lassen eine ähnliche Funktion von *ymoBA* im Pathogen vermuten.

4. Diskussion

Interessanterweise zeigte sich bei den hier durchgeführten Versuchen, dass lediglich die Komplementation mit *ymoBA* zu einer Adhäsion auf Wildtyp-Niveau führte. Die Transformation mit *ymoA* allein komplementierte den Phänotyp von Tn5_No. 5 lediglich in Bezug auf die Pigmentierung. Die Adhäsion war allerdings stärker als die des *E. tasmaniensis* 1/99 Wildtyps, aber schwächer als die Adhäsion der Tn5_No. 5 Mutante. Erste Untersuchungen zu Unterschieden bei der Adhäsion auf der Pflanzenoberfläche wurden auf *in vitro* Pflanzen durchgeführt. Nach der Applikation von 1×10^8 cfu / ml *E. tasmaniensis* 1/99 bzw. der Tn5_No. 5 Mutante lagen die Zelldichte bei beiden Behandlungsvarianten in demselben Bereich (ca. 4×10^5 cfu / Blatt), sodass auf der Pflanze kein Adhäsionsvorteil bei der Mutante ausgemacht werden konnte.

Interessant wäre der Vergleich der Phänotypen zwischen der *E. tasmaniensis* 1/99 Tn5_No. 5 Mutante und einer *ymoB* Knock-Out Mutante in *E. amylovora*. Pigmentierung und verstärkte Adhäsion könnten einen Vorteil bei der Entwicklung auf der Pflanze für den Antagonisten bedeuten, aber auch eine Rolle bei der Virulenz des Pathogens spielen. Das Verständnis potentieller Regulationsmechanismen von Pathogenitätsfaktoren bietet neue Angriffspunkte bei der Bekämpfung eines Pathogens. Die Konstruktion der *ymoB* Knock-Out Mutante in *E. amylovora* über Gene Doctoring (Lee et al. 2009) war im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht erfolgreich.

4.7 In planta Screening von Feuerbrandantagonisten

Bei der Arbeit mit Biokontrollorganismen zeigte sich immer wieder, dass eine Pathogen-Hemmung *in vitro* nicht unbedingt auf eine vergleichbare Wirkung *in planta* übertragbar ist (Anith et al. 2003; Dinu et al. 2007; Shehata et al. 2016). Auch mit den in dieser Arbeit getesteten Organismen *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 konnte bei der Ko-Kultivierung mit dem Feuerbranderreger eine vergleichbare Hemmung mit beiden Antagonisten erreicht werden. Auf der Pflanze hingegen war ein deutlicher Unterschied bezüglich ihrer Effektivität zu beobachten, sowohl in den Blütenversuchen im Labor als auch im Freilandversuch. Verschiedene Aspekte könnten bei diesen Unterschieden eine Rolle spielen, dazu zählt z. B. die Anpassung an die Wachstumsbedingungen auf der Pflanze. *E. tasmaniensis* DS08 und *B. amyloliquefaciens* FZB42 besiedeln unterschiedliche Habitate (Blüte bzw. Boden). Bei Antagonisten, die nicht auf den Lebensraum des zu kontrollierenden Pathogens spezialisiert sind, ist die Anpassung an den ungewohnten Lebensraum ein essentieller Faktor, der in Pflanzenversuchen untersucht werden muss, bevor eine Entwicklung des Antagonisten in Richtung Praxis vorangetrieben werden kann.

4. Diskussion

Je nach Pathogen ergeben sich Unterschiede bezüglich des Pflanzensystems, mit dem Wirkung und Entwicklung des Biokontrollorganismen untersucht werden kann.

Der Antagonist *Sphingomonas* zeigte bei der Inokulation von *A. thaliana* eine Schutzfunktion gegenüber dem Pathogen *P. syringae* (Innerebner et al. 2011). Dies ermöglicht die Arbeit auf einer Modellpflanze, die vergleichsweise schnell angezogen werden kann (Whalen et al. 1991). Im Feuerbrand ist die Arbeit mit einem geeigneten Pflanzensystem schwieriger, da der Wirtspflanzenkreis vom *E. amylovora* vor allem holzige Pflanzen betrifft. Als geeignetes Laborsystem hat sich u.a. der Birnenscheibenassay etabliert. Auf unreifen Birnen (entweder als ganze Frucht oder in Scheiben) können nach Infektion mit *E. amylovora* charakteristische Symptome in Form von nekrotischem Gewebe und Schleimtropfen beobachtet werden. Dieser Assay wurde bereits in mehreren Studien verwendet, um verschiedene Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren des Feuerbranderreger zu untersuchen (Geier & Geider 1993; Bereswill & Geider 1997; Bogdanove et al. 1998). Um einen hohen Durchsatz zu erreichen, der beispielsweise für das Screening einer Vielzahl von Mutanten nach einer Transposonmutagenese notwendig ist, bieten sich Birnen, aufgrund der Möglichkeit mehrere Gewebestücke zu verwenden, besonders an. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Assay entwickelt werden, der in einem 96-Well Format auf Birnenscheiben die Detektion eines GFP-markierten Reporterstammes von *E. amylovora* bereits 48 h bis 72 h nach der Inokulation ermöglicht. Zwar konnte in den Kontrollansätzen eine deutliche Abgrenzung zwischen der Positiv- und Negativkontrolle beobachtet werden, aber die Schwankungen in einzelnen Wiederholungen waren vor allem in den auf den behandelten Birnen relativ groß (bis 29%). Bei dem Scan der einzelnen Wells im 5x5 Format zeigte sich, dass die Signalverteilung auf der Birne teils inhomogen war. Eine Boxplot-Analyse der Fluoreszenzenintensitäten ermöglichte eine Darstellung der Fluoreszenzverteilung bei dem Ausreißer und Schwankungen, die durch die inhomogene Verteilung auf der Birne zustande kommen, besser berücksichtigt werden konnten. Ein Vergleich der Mediane der behandelten Kontrolle zeigte eine geringere Schwankung untereinander (etwa 9%). Die Box Plot Analyse bietet eine bessere Einschätzung der Daten und ermöglicht einen Überblick über den Schwankungsbereich im Assay. Das Screening im 96-Well Format bietet somit einen Ansatz zum effektiven *in planta* Screening von Feuerbrandantagonisten.

4.8 Fazit

Sowohl *E. tasmaniensis* DS08 als auch *B. amyloliquefaciens* FZB42 haben das Potential den Feuerbranderreger *E. amylovora* im Freiland zu hemmen. Bei der Applikation von 1×10^8 cfu / ml einer Antagonistensuspension wird eine hohe Zelldichte von bis zu 1×10^5 cfu pro Blüte erreicht, was den Antagonisten einen soliden Vorteil gegenüber *E. amylovora* bietet. Beide Antagonisten lassen sich für die praktische Anwendung im Feld ohne große Einschränkungen formulieren. Die Sporen von *B. amyloliquefaciens* FZB42 zeigten nach der Applikation auf der Apfelblüte eine schnelle Aktivierung. Durch einen Nährstoffzusatz in der Formulierung konnten bisher beobachtete Nachteile bei der Reaktivierung der Zellen von *E. tasmaniensis* DS08 aufgehoben werden. Der Antagonist war bei 4°C für eine Feuerbrandsaison gut haltbar. Beide Antagonisten konnten über den Zeitraum der Apfelblüte im Freiland detektiert werden, was eine Etablierung in Feld bestätigt. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen in den drei Versuchsjahren ist eine abschließende Evaluation der Antagonisten jedoch nicht möglich. Nichtsdestotrotz liegen die erreichten Wirkungsgrade von ca. 60% im Fall von *E. tasmaniensis* DS08 in einem mittleren Bereich, während die ca. 40% für *B. amyloliquefaciens* FZB42 recht niedrig sind. Beide Ergebnisse sind noch nicht ausreichend für den Einsatz als Biokontrollorganismen in der Praxis. Besonders in Bezug auf *B. amyloliquefaciens* FZB42 gibt es ungeklärte Fragen, die mit einem verminderten Wirkungsgrad einhergehen. Eine frühe Sporulation auf der Blüte nach der Applikation, wie sie im Labor beobachtet werden konnte, kann einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Antagonisten haben. Sowohl die Untersuchung des Zustandes der Zellen im Feld, als auch das Testen von Additiven, die die Wachstumsbedingungen für *B. amyloliquefaciens* FZB42 fördern, kann zu einer Verbesserung der Hemmwirkung führen. Schwankungen in der Wirksamkeit zwischen einzelnen Behandlungen sind für biologische Systeme nicht ungewöhnlich und sind von einer Reihe Faktoren abhängig (Applikationszeitpunkt, Blütenzustand, Temperatur etc.), was auch durch die unterschiedlichen Befallsstärken des Feuerbranderregers über die Jahre ersichtlich ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu klären, wie diese starken Schwankungen der Antagonisten innerhalb eines Versuchsjahres zustande kommen.

4.9 Ausblick

Feuerbrandbekämpfung ist aufgrund der hohen Verluste, die die Krankheit im Obstbau anrichten kann, und der begrenzten Möglichkeiten zur Behandlung von Wirtspflanzen ein wichtiges Thema. Wenngleich im Bereich der Züchtungsforschung bereits einige Fortschritte bezüglich des Verständnisses von Resistenzmechanismen gemacht werden konnten, ist es noch ein weiter Weg bis für den Anwender dieses Wissen nutzbar ist. Die Züchtung resistenter Arten ist ein Prozess, der viele Jahre in Anspruch nimmt (Peil et al. 2009). Biologische Kontrollorganismen bieten sich aufgrund ihres natürlichen Vorkommens und diverser Eigenschaften, mit denen sie mit einem Pathogen interagieren können, als schonende, alternative Bekämpfungsmöglichkeit zu Antibiotika an (Pal & Mcspadden Gardener 2006). Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Organismen haben das Potential den Feuerbranderreger unter Freilandbedingungen zu hemmen. Die Gattung *Bacillus* bietet ein breites Spektrum an potentiellen Kandidaten, die eine Wirkung auf *E. amylovora* zeigen. Unterschiede verschiedener Arten in Bezug auf die Produktion von Toxinen oder der Anpassung an die Umweltbedingungen auf der Blüte können einen Einfluss auf die Wirkung gegen den Feuerbrand haben und bleiben abzuklären. Neue Methoden wie Next Generation Sequencing ermöglichen die Untersuchung verschiedener Prozesse von Pathogenen, Biokontrollorganismen und Wirtspflanzen, die wichtige Informationen für die Suche nach einem effektiven Antagonismus liefern können (Kamber et al. 2016; Krober et al. 2016). Für ein effektives Screening einer Vielzahl von potentiellen Antagonisten ist die Entwicklung eines für den Feuerbrand spezifisches Pflanzensystem mit einem hohen Durchsatz optimal. Ein erster Ansatz konnte im Rahmen dieser Arbeit mit einem adaptierten Birnenscheibenassay im 96-Well Format erbracht werden. Die Etablierung dieses System könnte nicht nur das Screening von Antagonisten erleichtern, sondern auch für Mutageneseuntersuchungen zur Identifikation von essentiellen Genen, die bei dem Antagonismus gegen *E. amylovora* eine Rolle spielen, genutzt werden. Mit Hilfe dieses Wissens lässt sich gezielter nach Feuerbrandantagonisten suchen und die Entwicklung biologischer Kontrollorganismen gegen *E. amylovora* vorantreiben.

5. Literatur

- Aldrige, P., M. Metzger and K. Geider, 1997 Genetic of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Mol Gen Genet* 256: 611-619.
- Aldwinckle, H. S., M. V. Bhaskara Reddy and L. Norelli, 2002 Evaluation of Fire Blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compound, and other materials. *Acta Hort* 590: 325-331.
- Anith, K. N., N. V. Radhakrishnan and T. P. Manomohandas, 2003 Screening of antagonistic bacteria for biological control of nursery wilt of black pepper (*Piper nigrum*). *Microbiol Res* 158: 91-97.
- Arrage, A., T. J. Phelps, R. Benoit and D. C. White, 1993 Survival of Subsurface Microorganisms Exposed to UV Radiation and Hydrogen Peroxide. *Appl Environ Microbiol* 59: 3545-3550.
- Ayers, A. R., S. B. Ayers and R. N. Goodman, 1979 Extracellular Polysaccharide of *Erwinia amylovora*: a Correlation with Virulence. *Appl Environ Microbiol* 38: 659-666.
- Bais, H. P., R. Fall and J. M. Vivanco, 2004 Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiol* 134: 307-319.
- Balsabore, C., A. Juarez, C. Madrid, M. Mourino, A. Prenafeta and F. J. Munoa, 1996 Complementation of the *hha* mutation in *Escherichia coli* by the *ymoA* gene from *Yersinia enterocolitica*: dependence on the gene dosage. *Microbiology* 142: 1841-1846.
- Bargabus, R. L., N. K. Zidack, J. E. Sherwood and B. J. Jacobsen, 2004 Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biol Control* 30: 342-350.
- Barrios, A. F., R. Zuo, D. Ren and T. K. Wood, 2006 Hha, YbaJ, and OmpA Regulate *Escherichia coli* K12 Biofilm Formation and Conjugation Plasmids Abolish Motility. *Biotechnol Bioeng* 93: 188-200.
- Belleman, P., and K. Geider, 1992 Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J Gen Microbiol* 138: 931-940.
- Bereswill, S., and K. Geider, 1997 Characterization of the *rscB* Gene from *Erwinia amylovora* and Its Influence on Exopolysaccharide Synthesis and Virulence of the Fire Blight Pathogen. *J Bacteriol* 179: 1354-1361.
- Billing, E., 2007 Challenges in Adaptation of Plant Disease Warning Systems to New Locations: Re-Appraisal of Billing's Integrated System for Predicting Fire Blight in a Warm Dry Environment. *Phytopathology* 97: 1036-1039.
- Billing, E., 1980 Fireblight (*Erwinia amylovora*) and weather: a comparison of warning systems. *Annual applied Biology* 95: 365-377.
- bio-ferm, 2012, Blossom Protect User Manual, http://www.bio-ferm.com/fileadmin/user_upload/download/Blossom_Protect/Blossom_Protect_Produkthandbuch_2012.pdf
- Bogdanove, A. J., J. F. Kim, Z. Wei, P. Kolchinsky, A. O. Charkowski, A. K. Conlin, A. Collmer and S. V. Beer, 1998 Homology and functional similarity of an *hrp*-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. *Plant Biology* 95: 1325-1330.
- Bogino, P. C., L. Oliva Mde, F. G. Sorroche and W. Giordano, 2013 The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *Int J Mol Sci* 14: 15838-15859.

5. Literatur

- Bogs, J., I. Bruchmuller, C. Erbar and K. Geider, 1998 Colonization of Host Plants by the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* Marked with Genes for Bioluminescence and Fluorescence. *Phytopathology* 88: 416-421.
- Bogs, J., and K. Geider, 2000 Molecular Analysis of Sucrose Metabolism of *Erwinia amylovora* and Influence on Bacterial Virulence. *J Bacteriol* 182: 5351-5358.
- Borriss, R., 2011 Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* D. K. Maheshwari (Ed.). Chapter 3: 41-76.
- Bradáčová, K., N. F. Weber, N. Morad-Talab, M. Asim, M. Imran, M. Weinmann and G. Neumann, 2016 Micronutrients (Zn/Mn), seaweed extracts, and plant growth-promoting bacteria as cold-stress protectants in maize. *Chem Biol Technol Agric* 3: 19-28.
- Braun, P. G., and P. D. Hildebrand, 2005 Infection, carbohydrate utilization, and protein profiles of apple, pear, and raspberry isolates of *Erwinia amylovora*. *Can J Plant Pathol* 27: 338-346.
- Breed, R. S., E. G. D. Murray and N. R. Smith, 1957 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkoms Company, Baltimore, USA.
- Brenner, D. J., N. R. Krieg, S. J. T. and G. M. Garrity, 2005 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Boston, USA.
- Brewer, M. T., and R. P. Larkin, 2005 Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24: 939-950.
- Burrill, T. J., 1883 New species of *Micrococcus* (bacteria). *Am. Nat.* 17: 319-320.
- Burrill, T. J., 1871 Report on vegetable physiology. *Trans Ill State Hort Soc* 5: 197-199.
- Buttner, D., and S. Y. He, 2009 Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiol* 150: 1656-1664.
- Cabrefiga, J., and E. Montesinos, 2005 Analysis of Aggressiveness of *Erwinia amylovora* Using Disease-Dose and Time Relationships. *Phytopathology* 95: 1430-1437.
- Chen, X. H., A. Koumoutsi, R. Scholz and R. Borriss, 2009a More than Anticipated - Production of Antibiotics and Other Secondary Metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16: 14-24.
- Chen, X. H., A. Koumoutsi, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Sussmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk and R. Borriss, 2007 Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* 25: 1007-1014.
- Chen, X. H., R. Scholz, M. Borriss, H. Junge, G. Mogel, S. Kunz and R. Borriss, 2009b Difficidin and Bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol* 140: 38-44.
- Chen, X. H., J. Vater, J. Piel, P. Franke, R. Scholz, K. Schneider, A. Koumoutsi, G. Hitzeroth, N. Grammel, A. W. Strittmatter, G. Gottschalk, R. D. Sussmuth and R. Borriss, 2006 Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol* 188: 4024-4036.
- Chizzali, C., M. N. Khalil, T. Beuerle, W. Schuehly, K. Richter, H. Flachowsky, A. Peil, M. V. Hanke, B. Liu and L. Beerhues, 2012 Formation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins in the transition zones of fire blight-infected stems of *Malus domestica* cv. 'Holsteiner Cox' and *Pyrus communis* cv. 'Conference'. *Phytochemistry* 77: 179-185.
- Danhorn, T., and C. Fuqua, 2007 Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61: 401-422.

5. Literatur

- Davey, M. E., and A. O'Toole G, 2000 Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 847-867.
- De Curtis, F., D. V. de Felice, G. Ianiri, V. De Cicco and R. Castoria, 2012 Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. *Int J Food Microbiol* 159: 17-24.
- Denny, T. P., 1995 Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 173-197.
- Dinu, A., A. Kumar, R. Aravind and S. J. Eapen, 2007 An improved method for selection of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* Leonian infections in black pepper (*Piper nigrum* L.). *J Spices Aromatic Crop* 16: 1-7.
- Dunlap, P., 2014 Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 144: 37-64.
- Edgecomb, D. W., and D. Manker, 2006 *Bacillus subtilis* strain QST 713, bacterial disease control in fruit, vegetable and ornamental production. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases, 1st Symposium 2005. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 408: 167-169
- El Ghaouth, A., J. L. Smilanick, M. E. Wisniewski and C. L. Wilson, 2000 Improved Control of Apple and Citrus Fruit Decay with a Combination of *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-Glucose. *Plant Disease* 84: 249-253.
- Ellison, D. W., B. Young, K. Nelson and V. L. Miller, 2003 YmoA Negatively Regulates Expression of Invasin from *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 185: 7153-7159.
- Emmert, E., and J. Handelsman, 1999 Bicontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol Lett* 171: 1-9.
- EPPO, 2016a, Global Database, <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/distribution>
- EPPO, 2016b, Global Database <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIAM/categorization>
- Errington, J., 1993 *Bacillus subtilis* Sporulation: Regulation of Gene Expression and Control of Morphogenesis. *Microbiol Rev* 57: 1-33.
- Fahrentrapp, J., G. A. Broggin, M. Kellerhals, A. Peil, K. Richter, E. Zini and C. Gessler, 2013 A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC–NBS–LRR. *Tree Genet Genomes* 9: 237-251.
- Falkenstein, H., P. Bellemann, S. Walter, W. Zeller and K. Geider, 1988 Identification of *Erwinia amylovora*, the Fireblight Pathogen, by Colony Hybridization with DNA from Plasmid pEA29. *Appl Environ Microbiol* 54: 2798-2802.
- Fried, A., 2009 Feuerbrand-Bekämpfungsversuch 2008. *Obstbau* 34: 13-17.
- Fried, A., 2008 Feuerbrand-Bekämpfungsversuch und Verträglichkeitsprüfung von Feuerbrand-Präparaten 2007. *Obstbau* 33: 72-75.
- Fried, A., 2013 Feuerbrandbekämpfung: Ersatz für Streptomycin nach 20 Versuchsjahren gefunden? *Obstbau* 39: 134-136.
- Gaudriault, S., L. Malandrin, J. P. Paulin and M. A. Barny, 1997 DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol Microbiol* 26: 1057-1069.
- Geider, K., 2000 Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: Structure, Biosynthesis, Regulation, Role in Pathogenicity of Amylovoran and Levan In: *Fire Blight The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. J. L. Vanneste (Ed.). Chapter 7: 117-140.
- Geider, K., G. Auling, Z. Du, V. Jakovljevic, S. Jock and B. Volksch, 2006a *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2937-2943.

5. Literatur

- Geider, K., V. Jakovljevic, M. Mohammadi and S. Jock, 2006b Characterization of epiphytic bacteria from Australia and Europe as possible fire blight antagonists. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases 1st Symposium 2005*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 2006 408: 245-248
- Geier, G., and K. Geider, 1993 Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Path* 42: 387-404.
- Gill, J. J., A. M. Svircev, R. Smith and A. J. Castle, 2003 Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2133-2138.
- Gross, M., G. Geier, K. Rudolph and K. Geider, 1992 Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Path* 40: 371-381.
- Guest, D., and J. Brown, 1997 Plant Defences Against Pathogens. In: Brown, J. F. & Ogle, J. H. (Eds) *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Rockvale Publications Armidale, New South Wales: 263-285.
- Haas, D., and G. Defago, 2005 Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent Pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3: 307-319.
- Hattingh, M. J., S. V. Beer and E. W. Lawson, 1986 Scanning Electron Microscopy of Apple Blossoms colonized by *Erwinia amylovora* and *E. herbicola*. *Phytopathology* 76: 900-904.
- He, S. Y., K. Nomura and T. S. Whittam, 2004 Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694: 181-206.
- Heidenreich, M. C. M., M. R. CorralGarcia, E. A. Momol and T. J. Burr, 1997 Russet of Apple Fruit Caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Disease* 81: 337-342.
- Hildebrand, E. M., and E. F. Phillips, 1936 The Honeybee and the Beehive in Relation to Fire Blight. *J Agri Res* 52: 789-810.
- Hyman, L. J., V. Dewasmes, I. K. Toth and M. C. M. Perombelon, 1997 Improved PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tuber peel extract by prior enrichment on a selective medium. *Lett Appl Microbiol* 25: 143-147.
- Ibrahim, O., and S. Rossall, 2001 Enhancement of control by nutrient formulations of selected biocontrol agents against fusarium crown and root rot of tomato. *J Trop Agric and Fd Sc* 29: 167-176.
- Idris, E. E., D. J. Iglesias, M. Talon and R. Borriss, 2007 Tryptophan-dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *MPMI* 20: 619-626.
- Innerebner, G., C. Knief and J. A. Vorholt, 2011 Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a Controlled Model System. *Appl Environ Microbiol* 77: 3202-3210.
- Iriarte, F. B., B. Balogh, M. T. Momol, L. M. Smith, M. Wilson and J. B. Jones, 2007 Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Appl Environ Microbiol* 73: 1704-1711.
- Ishimaru, C. A., E. J. Klos and R. R. Brubaker, 1988 Multiple Antibiotic Production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 78: 746-750.
- Jackson, M. W., E. Silva-Herzog and G. V. Plano, 2004 The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol* 54: 1364-1378.
- Jakovljevic, V., S. Jock, Z. Du and K. Geider, 2008 Hypersensitive response and acyl-homoserine lactone production of the fire blight antagonists *Erwinia tasmaniensis* and *Erwinia billingiae*. *Microbial Biotechnology* 1: 416-424.

5. Literatur

- Janisiewicz, W. J., 1994 Enhancement of Biocontrol of Blue Mold with the Nutrient Analog 2-Deoxy-D-Glucose on Apples and Pears. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2671-2676.
- Johnson, K. B., T. L. Sawyer and T. N. Temple, 2006 Rates of Epiphytic Growth of *Erwinia amylovora* on Flowers Common in the Landscape. *Plant Disease* 90: 1331-1336.
- Johnson, K. B., and V. O. Stockwell, 1998 Management of Fire Blight: A Case Study in Microbial Ecology. *Annu Rev Phytopathol* 36: 227-248.
- Johnson, K. B., V. O. Stockwell, R. J. McLaughlin, D. Sugar, J. E. Loper and R. G. Roberts, 1993 Effect of Antagonistic Bacteria on Establishment of Honey-Bee-Dispersed *Erwinia amylovora* in Pear Blossoms and on Fire Blight Control. *Phytopathology* 83: 995-1002.
- Joyner, D. C., and S. E. Lindow, 2000 Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor. *Microbiology* 146: 2435-2445.
- Kamber, T., J. P. Buchmann, J. F. Pothier, T. H. Smits, T. Wicker and B. Duffy, 2016 Fire blight disease reactome: RNA-seq transcriptional profile of apple host plant defense responses to *Erwinia amylovora* pathogen infection. *Sci Rep* 6: 1-12.
- Kloepper, J. W., C. M. Ryu and S. Zhang, 2004 Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Koczan, J. M., B. R. Lenneman, M. J. McGrath and G. W. Sundin, 2011 Cell Surface Attachment Structures Contribute to Biofilm Formation and Xylem Colonization by *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 77: 7031-7039.
- Koczan, J. M., M. J. McGrath, Y. Zhao and G. W. Sundin, 2009 Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amylovoran and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity. *Phytopathology* 99: 1237-1244.
- Koumoutsis, A., X. H. Chen, A. Henne, H. Liesegang, G. Hitzeroth, P. Franke, J. Vater and R. Borriss, 2004 Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *J Bacteriol* 186: 1084-1096.
- Krebs, B., B. Hoding, S. Kubart, M. A. Workie, H. Junge, G. Schmiede-Knecht, R. Grosch, H. Bochow and M. Hevesi, 1998 Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *J Plant Dis Protect* 105: 181-197.
- Krober, M., B. Verwaaijen, D. Wibberg, A. Winkler, A. Puhler and A. Schluter, 2016 Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *J Biotechnol* 231: 212-223.
- Kube, M., A. M. Migdoll, I. Gehring, K. Heitmann, Y. Mayer, H. Kuhl, F. Knaust, K. Geider and R. Reinhardt, 2010 Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. *BMC Genomics* 11: 1-15.
- Kube, M., A. M. Migdoll, I. Muller, H. Kuhl, A. Beck, R. Reinhardt and K. Geider, 2008 The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*. *Environ Microbiol* 10: 2211-2222.
- Landa, B. B., J. A. Navas-Cortes and R. M. Jimenez-Diaz, 2004 Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53: 341-352.
- Le-Tien, C., R. Lafortune, F. Shareck and M. Lacroix, 2007 DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. *Talanta* 71: 1969-1975.

5. Literatur

- Lebhuhn, M., T. Heulin and A. Hartmann, 1997 Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiol Ecol* 22: 325-334.
- Lee, D. J., L. E. Bingle, K. Heurlier, M. J. Pallen, C. W. Penn, S. J. Busby and J. L. Hobman, 2009 Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol* 9: 252.
- Lindberg, T., and U. Granhall, 1984 Isolation and Characterization of Dinitrogen-Fixing Bacteria from the Rhizosphere of Temperature Cereals and Forage Grasses. *Appl Environ Microbiol* 48: 683-689.
- Lindow, S. E., and M. T. Brandl, 2003 Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69: 1875-1883.
- Loper, J. E., and J. S. Buyer, 1991 Siderophores in Microbial Interactions on Plant Surfaces. *MPMI* 4: 5-13.
- Lopez, M. M., M. Rosello, P. Llop, S. Ferrer, R. Christen and L. Gardan, 2011 *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 561-567.
- Madrid, C., J. M. Nieto and A. Juárez, 2001 Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *International Journal of Medical Microbiology* 291: 425-432.
- Maes, M., K. Orye, S. Bobev, B. Devreese, J. Van Beeumen, A. De Bruyn, R. Busson, P. Herdewijn, K. Morreel and E. Messens, 2001 Influence of amylovoran production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovoran structure in *E. amylovora* isolates from *Rubus*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 839-844.
- Martinec, T., and M. Kocur, 1964 A Taxonomic Study of *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920. *Int B Bact Nomencl T* 14: 5-14.
- Mercier, J., and S. E. Lindow, 1996 A Method Involving Ice Nucleation for the Identification of Microorganisms Antagonistic to *Erwinia amylovora* on Pear Flowers. *Phytopathology* 86: 940-945.
- Miller, P. W., 1929 Studies of Fire Blight on Apple in Wisconsin. *J Agri Res* 39: 579-621.
- Miller, T. D., and M. N. Schroth, 1972 Monitoring the Epiphytic Population of *Erwinia amylovora* on Pear with a Selective Medium. *Phytopathology* 62: 1175-1182.
- Mohammadi, M., L. Burbank and M. C. Roper, 2012 Biological Role of Pigment Production for the Bacterial Phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Appl Environ Microbiol* 78: 6859-6865.
- Mohammadi, M., and K. Geider, 2007 Autoinducer-2 of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* and other plant-associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 266: 34-41.
- Moltmann, E., 2004 10 Jahre Erfahrungen mit der Feuerbrandprognose in Baden-Württemberg (1994-2003). *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 56: 13-16.
- Momol, M. T., J. L. Norelli, D. E. Piccioni, E. A. Momol, H. L. Gustafson, J. N. Cummins and H. S. Aldwinckle, 1998 Internal Movement of *Erwinia amylovora* Through Symptomless Apple Scion Tissues into the Rootstock. *Plant Disease* 82: 646-650.
- Mootz, H. D., R. Finking and M. A. Marahiel, 2001 4'-Phosphopantetheine Transfer in Primary and Secondary Metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 276: 37289-37298.
- Moszer, I., 1998 The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Lett* 430: 28-36.
- Nieto, J. M., M. Carmona, S. Bolland, Y. Jubete, F. de la Cruz and A. Juárez, 1991 The *hha* gene modulates haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 1285-1293.

5. Literatur

- Nieto, J. M., C. Madrid, E. Miquelay, J. L. Parra, S. Rodriguez and A. Juarez, 2002 Evidence for Direct Protein-Protein Interaction between Members of the Enterobacterial Hha/YmoA and H-NS Families of Proteins. *J Bacteriol* 184: 629-635.
- Nimtz, M., A. Mort, T. Domke, V. Wray, Y. Zhang, F. Qiu, D. Coplin and K. Geider, 1996 Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydr Res* 287: 59-76.
- Niu, B., J. Vater, C. Rueckert, J. Blom, M. Lehmann, J. J. Ru, X. H. Chen, Q. Wang and R. Borriss, 2013 Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia spp.* by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1. *BMC Microbiol* 13: 137.
- Nuclo, R. L., K. B. Johnson and V. O. Stockwell, 1998 Secondary Colonization of Pear Blossoms by Two Bacterial Antagonists of the Fire Blight Pathogen. *Plant Disease* 82: 661-668.
- Oh, C. S., J. F. Kim and S. V. Beer, 2005 The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection double dagger. *Mol Plant Pathol* 6: 125-138.
- Pal, K. K., and B. McSpadden Gardener, 2006 Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*: 1-25.
- Palacio-Bielsa, A., M. Rosello, P. Llop and M. M. Lopez, 2012 *Erwinia spp.* from pome fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. *Trees Struct Funct* 26: 13-29.
- Peil, A., V. G. M. Bus, K. Geider, K. Richter, H. Flachowsky and M. V. Hanke, 2009 Improvement of Fire Blight Resistance in Apple and Pear. *International Journal of Plant Breeding* 3: 1-27.
- Pester, D., R. Milcevicova, J. Schaffer, E. Wilhelm and S. Blumel, 2012 *Erwinia amylovora* Expresses Fast and Simultaneously *hrp/dsp* Virulence Genes during Flower Infection on Apple Trees. *PLoS One* 7: 1-9.
- Powney, R., T. H. Smits, T. Sawbridge, B. Frey, J. Blom, J. E. Frey, K. M. Plummer, S. V. Beer, J. Luck, B. Duffy and B. Rodoni, 2011 Genome Sequence of an *Erwinia amylovora* Strain with Pathogenicity Restricted to *Rubus* Plants. *J Bacteriol* 193: 785-786.
- Priest, F. G., M. Goodfellow, L. A. Shute and R. C. W. Berkeley, 1987 *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. rev. *Int J Syst Bacteriol* 37: 69-71.
- Pusey, P. L., 1997 Crab Apple Blossoms as a Model for Research on Biological Control of Fire Blight. *Phytopathology* 87: 1096-1102.
- Pusey, P. L., 2000 The Role of Water in Epiphytic Colonization and Infection of Pomaceous Flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 90: 1352-1357.
- Pusey, P. L., V. O. Stockwell and M. Mazzola, 2009 Epiphytic Bacteria and Yeasts on Apple Blossoms and Their Potential as Antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99: 571-581.
- Raajmakers, J. M., M. Vlami and J. T. de Souza, 2002 Antibiotic production by bacterial biocontrol pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Reva, O. N., C. Dixelius, J. Meijer and F. G. Priest, 2004 Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 249-259.
- Rhim, S. L., B. Voelksch, L. Gardan, J. P. Paulin, C. Langlotz, W. S. Kim and K. Geider, 1999 *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathol J* 48: 514-520.
- Ries, S. M., and A. G. Otterbacher, 1977 Occurrence of fire blight on thornless blackberry in Illinois. *Plant Disease* 61: 232-235.

5. Literatur

- Romantschuk, M., E. Roine, T. Ojanen, J. Van Doorn, J. Louhelainen, E.-L. Nurmiaho-Lassila and K. Haahtela, 1994 Fimbria (pilus) mediated attachment of *Pseudomonas syringae*, *Erwinia rhapontici* and *Xanthomonas campestris* to plant surfaces In: Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence C. I. Kado and J. H. Crosa (Ed.). 67-77.
- Ryu, C.-M., J. Kim, O. Choi, S. H. Kim and C. S. Park, 2006 Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biol Control* 39: 282-289.
- Sallam, N. A., S. N. Riad, M. S. Mohamed and E.-e. A. S., 2013 Formulations of *Bacillus spp.* and *Pseudomonas fluorescens* for Biocontrol of Cantaloupe Root Rot caused by *Fusarium solani* *J Plant Prot Res* 53: 295-300.
- Samarakoon, T., S. Y. Wang and M. H. Alford, 2013 Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive. *Appl Plant Sci* 1: 1-3.
- Sambrook, J., E. F. Fritschi and T. Maniatis, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sammer, U. F., K. Reiher, D. Spiteller, A. Wensing and B. Volksch, 2012 Assessment of the relevance of the antibiotic 2-amino-3-(oxirane-2,3-dicarboxamido)-propanoyl-valine from *Pantoea agglomerans* biological control strains against bacterial plant pathogens. *Microbiology* 1: 438-449.
- Sammer, U. F., B. Volksch, U. Mollmann, M. Schmidtke, P. Spiteller, M. Spiteller and D. Spiteller, 2009 2-Amino-3-(Oxirane-2,3-Dicarboxamido)-Propanoyl-Valine, an Effective Peptide Antibiotic from the Epiphyte *Pantoea agglomerans* 48b/90. *Appl Environ Microbiol* 75: 7710-7717.
- Schaad, N. W., Y. Berthier-Schaad, A. Sechler and D. Knorr, 1999 Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato Tubers by BIO-PCR and an Automated Real-Time Fluorescence Detection System. *Plant Disease* 83: 1095-1100.
- Schaad, N. W., S. S. Cheong, T. S., E. Hatiloukas and N. J. Panopoulos, 1995 A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. *Phytopathology* 85: 243-248.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne, 2012 PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113: 1014-1026.
- Schroth, M. N., S. V. Thomson and D. C. Hildebrand, 1974 Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annu Rev Phytopathol* 12: 389-412.
- Seibold, A., A. Fried, S. Kunz, E. Moltmann, E. Lange and W. Jelkmann, 2004 Yeast as Antagonists against Fire Blight. *EPPO Bull* 34: 389-390.
- Shehata, H. R., E. M. Lyons, K. S. Jordan and M. N. Raizada, 2016 Relevance of *in vitro* agar based screens to characterize the anti-fungal activities of bacterial endophyte communities. *BMC Microbiol* 16: 1-7.
- Shoda, M., 2000 Bacterial Control of Plant Diseases. *J Biosci Bioeng* 89: 515-521.
- Shrestha, R., S. H. Lee, J. H. Hur and C. K. Lim, 2005 The Effects of Temperature, pH, and Bactericides on the Growth of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Plant Pathol J* 21: 127-131.
- Shwartz, H., D. Shtienberg, H. Vintal and G. Kritzman, 2003 The Interacting Effects of Temperature, Duration of Wetness and Inoculum Size on the Infection of Pear Blossoms by *Erwinia amylovora*, the Causal Agent of Fire Blight. *Phytoparasitica* 31: 174-187.

5. Literatur

- Sjulin, T., and S. V. Beer, 1977 Mechanism of Wilt Induction by Amylovorin in Cotoneaster Shoots and Its Relation to Wilting of Shoots Infected by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 68: 89-94.
- Stockwell, V. O., and B. Duffy, 2012 Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 31: 199-210.
- Stockwell, V. O., K. B. Johnson and J. E. Loper, 1998 Establishment of Bacterial Antagonists of *Erwinia amylovora* on Pear and Apple Blossoms as Influenced by Inoculum Preparation. *Phytopathology* 88: 506-513.
- Takkinen, K., R. F. Pettersson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Soderlund and L. Kaariainen, 1983 Amino Acid Sequence of α -Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* Deduced from the Nucleotide Sequence of the Cloned Gene. *J Biol Chem* 258: 1007-1013.
- Taylor, R. K., P. J. Guilford, R. G. Clark, C. N. Hale and R. L. S. Forster, 2001 Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zeal J Crop Hort* 29: 35-43.
- Taylor, R. K., C. N. Hale, W. R. Henshall, J. L. Armstrong and J. W. Marshall, 2003 Effect of inoculum dose on infection of apple (*Malus domestica*) flowers by *Erwinia amylovora*. *New Zeal J Crop Hort* 31: 325-333.
- Temple, T. N., V. O. Stockwell, J. E. Loper and K. B. Johnson, 2004 Bioavailability of Iron to *Pseudomonas fluorescens* Strain A506 on Flowers of Pear and Apple. *Phytopathology* 94: 1286-1294.
- Thomas, H. E., and P. A. Ark, 1934 Fire Blight of Pears and Related Plants. University of California, Berkely, USA.
- Thomson, S. V., 1985 The Role of the Stigma in Fire Blight Infections. *Phytopathology* 76: 476-482.
- Tuveson, R. W., R. A. Larson and J. Kagan, 1988 Role of Clones Carotenoid Genes Expressed in *Escherichia coli* in Protecting against Inactivation by Near-UV Light and Specific Phototoxic Molecules. *J Bacteriol* 170: 4675-4680.
- van der Zwet, T., and S. V. Beer, 1991 Fire Blight - Its Nature, Prevention, and Control: A Practical Guide to Integrated Disease Management. U.S. Department of Agriculture.
- van der Zwet, T., and H. L. Keil, 1979 Fire Blight - A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. U.S. Government Printing Office, Washington D. C., USA.
- Vanneste, J. L., 2000 What is Fire Blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to Control It? In: Fire Blight The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. J. L. Vanneste (Ed.). Chapter 1: 1-6.
- Vogel, C., G. Innerebner, J. Zingg, J. Guder and J. A. Vorholt, 2012 Forward Genetic *In Planta* Screen for Identification of Plant-Protective Traits of *Sphingomonas* sp. strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Appl Environ Microbiol* 78: 5529-5535.
- Walsh, C. T., 2004 Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Modularity and Versatility. *Science* 303: 1805-1810.
- Wei, Z. M., B. J. Sneath and S. V. Beer, 1992 Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* Genes in Response to Environmental Stimuli. *J Bacteriol* 174: 1875-1882.
- Wensing, A., M. Gernold and K. Geider, 2012 Detection of *Erwinia* species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR primers. *J Appl Microbiol* 112: 147-158.
- Whalen, M. C., R. W. Innes, A. F. Bent and B. J. Staskawicz, 1991 Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean. *Plant Cell* 3: 49-59.
- Wilcox, W. F., 1994 Fire Blight. Tree Fruit Crops Disease Identification Sheet.

5. Literatur

- Wilson, I. G., 1997 Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification Appl Environ Microbiol 63: 3741-3751.
- Wilson, M., H. A. S. Epton and D. C. Sigeo, 1992 Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the Stigma of Hawthorn Blossoms. Phytopathology 82: 914-918.
- Wilson, M., and S. E. Lindow, 1993 Interactions Between the Biological Control Agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in Pear Blossoms. Phytopathology 83: 117-123.
- Winslow, C. E., J. Broadhurst, R. E. Buchanan, C. Krumwiede, L. A. Rogers and G. H. Smith, 1920 The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol 5: 191-229.
- Wrather, J. A., J. Kuc and E. B. Williams, 1973 Protection of Apple and Pear Fruit Tissue Against Fireblight with Nonpathogenic Bacteria. Phytopathology 63: 1075-1076.
- Zhang, X., B. Li, Y. Wang, Q. Guo, X. Lu, S. Li and P. Ma, 2013 Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. Appl Microbiol Biotechnol 97: 9525-9534.
- Zhao, Y., S. E. Blumer and G. W. Sundin, 2005 Identification of *Erwinia amylovora* Genes Induced during Infection of Immature Pear Tissue. J Bacteriol 187: 8088-8103.