

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim\*), und Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg\*\*)

## Diagnose des Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora*) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und erste Ergebnisse zum Monitoring

Identification of the fireblight pathogen *Erwinia amylovora* with the polymerase chain reaction (PCR) and initial results for its monitoring

Von F. Berger\*), S. Bereswill\*\*), K. Geider\*\*) und W. Zeller\*)

### Zusammenfassung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde als Nachweismethode für den Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora*) zum Monitoring in befallenen Kernobstanlagen in Südwestdeutschland eingesetzt. Unter diesen Freilandbedingungen erwies sich die PCR als zuverlässige, sensitive und zeitsparende Methode, die das Spektrum der bereits verwendeten Diagnoseverfahren für den Feuerbrand erweitert.

**Stichwörter:** Feuerbrand, *Erwinia amylovora*, Diagnose, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Obstanlage

### Abstract

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for monitoring of fireblight (*Erwinia amylovora*) in field samples of diseased orchards in Southwest Germany. Under these field conditions PCR was a reliable, sensitive and time saving technique that can extend the spectrum of established diagnostic methods.

**Key words:** Fireblight, *Erwinia amylovora*, identification, Polymerase Chain Reaction (PCR), orchard

Nach dem letztjährigen massiven Auftreten des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*) im süddeutschen Kernobstbau erscheint eine frühzeitige Vorhersage des Infektionsrisikos und der anschließenden Symptombildung für die Praxis von großer Bedeutung, um den Erreger mit sofortigen Maßnahmen (wie z. B. rechtzeitiger Rückschnitt oder durch Einsatz eines Pflanzenschutzmittels) zu bekämpfen. Ein Monitoring in befallsgefährdeten Anlagen würde dann diese Maßnahmen unterstützen (ZELLER, 1975; ZELLER und JÖST, 1987).

Hier wird mit der molekularbiologischen Methode der Polymerase-Kettenreaktion<sup>1)</sup> (PCR, Polymerase Chain Reaction) ein Nachweisverfahren für *Erwinia amylovora* vorgestellt (BERESWILL et al., 1992; BERESWILL und GEIDER, 1994), das in umfangreichen Untersuchungen in verschiedenen Erwerbsobstanlagen von Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg bereits eingesetzt wurde. Mit dieser Methode konnte *Erwinia amylovora* auch in Pflanzenmaterial nachgewiesen werden. Hier soll jedoch vor allem auf die Vorgehensweise

für das Monitoring des Erregers zur Vorhersage des Feuerbrand-Risikos eingegangen werden.

Die PCR (MULLIS and FALOONA, 1987) ist ein Diagnosesystem, das *Erwinia amylovora* auf der Basis seiner DNA-Struktur spezifisch detektiert. Die Methode ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten, die auf diese Weise aus der GesamtdNA eines Organismus isoliert und dargestellt werden können. Die DNA des Plasmids pEA29 (FALKENSTEIN et al., 1988), das in Bakterien der Begleitflora nicht existiert, eignet sich besonders gut für den Nachweis von *Erwinia amylovora*, da es in mehreren Kopien pro Zelle vorkommt. Um geeignete Oligonukleotide für den PCR-Nachweis zu erhalten, wurde ein 0,9-Kb-großes *Pst*I-Fragment des *Erwinia amylovora*-Plasmids pEA29 kloniert und an beiden Enden sequenziert. Die Sequenzen A (CGGTTTTTAACGCTGGG) und B (GGGCAAATACTCGGATT) wurden als Primer für die Vermehrung des Fragments mit der PCR ausgewählt. Nach Optimierung der Reaktions-Parameter wurde ein Fragment von 900 Basenpaaren (Bp) aus der GesamtdNA von *Erwinia amylovora* spezifisch vermehrt und durch Elektrophorese als Bande im Agarosegel dargestellt (BERESWILL et al., 1992). Die Identität der Bande wurde durch Hybridisierung mit dem klonierten Original-Fragment von pEA29 sichergestellt. Bei anderen pflanzenassoziierten Bakterienarten der typischen Begleitflora von *Erwinia amylovora* konnte kein 900-Bp-großes PCR-Produkt erhalten werden.

### 1. Durchführung des Monitorings

#### Probennahme

In den zu kontrollierenden Obstanlagen und Streuobstflächen wurden randomisiert (zufallsverteilt) aus einer Fläche von etwa einem Hektar 50-60 Blütenbüschel bzw. visuell gesunde Blätter für eine Sammelprobe entnommen. Das Pflanzenmaterial wurde in Plastikbeutel gegeben und in einer Kühlbox zum Labor gebracht. Anschließend wurde die Probe aufbereitet oder im Kühlschrank bei 4–8°C gelagert. Alternativ wurden Blüten- bzw. Blattproben bereits vor Ort in Nutrient-Saccharose (NS)-Nährlösung gebracht.

#### Aufbereitung des Pflanzenmaterials

Für die Anreicherung der vorhandenen Bakterien wurde jede Sammelprobe in sterile Litergefäße mit 600 ml steriler NS-Nährlösung gegeben und bei Raumtemperatur für etwa 12 Stunden unter Belüf-

<sup>1)</sup> Die PCR-Analyse ist urheberrechtlich geschützt. Eine kommerzielle Nutzung der Untersuchungsmethode ist nur mit Genehmigung der Firma Hoffmann-La Roche möglich.

tung (70 Umdrehungen/Minute) geschüttelt, bis eine deutliche Trübung sichtbar war. Wenn eine weitere Aufbereitung nicht sofort möglich war, wurden 0,5 ml der Bakterienkultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin (86%, v/v) vermischt und die Proben bei  $-18^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank aufbewahrt. Für die PCR-Analyse wurden Proben der angereicherten Bakterien direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die NS-Nährlösung beeinträchtigte die Reaktion nicht.

#### NS-Nährlösung

Nutrient Broth	8,0 g
Saccharose	50 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Nährlösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren bei  $120^{\circ}\text{C}$  und Abkühlung wurden 50 mg Actidion (Cycloheximid) zur Hemmung von unerwünschtem Pilzwachstum hinzugefügt.

Alternativ wurden die Bakterien mit steriler Kochsalzlösung (0,6%) aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und durch Zentrifugation angereichert. Die Bakterien wurden anschließend in einem kleinen Volumen Kochsalzlösung suspendiert und für die PCR-Analyse direkt zum Reaktionsansatz gegeben.

Die Arbeitsabläufe zum Monitoring des Feuerbranderreger durch PCR-Analyse sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

## 2. Durchführung der PCR

#### Primer und Polymerase

Die PCR wurde in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Für die Detektion von *Erwinia amylovora* erwies sich eine Primer-Konzentration von 50 pmol (280 ng)/50  $\mu\text{l}$ -Ansatz und eine DNA-Polymerase-Konzentration von 0,5 bis 2 Einheiten/Ansatz (*Tth*-Polymerase bzw. *Taq*-Polymerase) als optimal. Die DNA-Polymerase wurde in PCR-Reaktionspuffer bzw. in einem vom Hersteller mitgelieferten Verdünnungspuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

#### PCR-Reaktionspuffer

Das für die Reaktion verwendete Puffersystem enthielt 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 16 mM Ammoniumsulfat, 1,5 mM Magnesiumchlorid (Merck), 5% (v/v) Dimethylsulfoxid, 160  $\mu\text{g/ml}$  Rinderserumalbumin (Fraktion V, Boehringer-Mannheim), 10 mM Mercaptoethanol und je 200  $\mu\text{M}$  der vier Desoxynukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP (als Natriumsalze, Boehringer-Mannheim).

Für die Herstellung der Reaktionsansätze wurde ein zweifach konzentrierter Reaktionspuffer verwendet. Um 10 ml dieser Reaktionspuffer herzustellen, wurden die folgenden Stammlösungen zusammenpipettiert und gemischt.

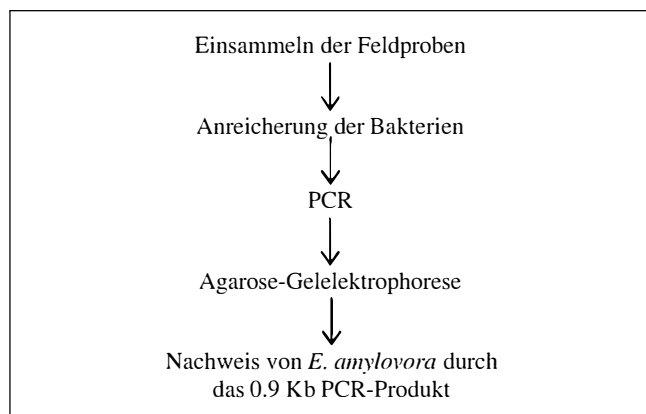


Abb. 1. Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe für das Monitoring von *Erwinia amylovora* durch PCR-Analyse.

Ammoniumsulfat, 320 mM	1 ml
Tris-HCl, 1,34 M (pH 8,8)	1 ml
Rinderserumalbumin, 3,2 mg/ml	1 ml
DMSO (p. A.)	1 ml
Magnesiumchlorid, 100 mM	0,3 ml
Mercaptoethanol (rein)	0,014 ml
desoxi-ATP, 20 mM	0,2 ml
desoxi-TTP, 20 mM	0,2 ml
desoxi-CTP, 20 mM	0,2 ml
desoxi-GTP, 20 mM	0,2 ml
destilliertes Wasser (ad 10 ml)	4,886 ml

Um einer Hydrolyse der Nukleotide vorzubeugen, wurde der Reaktionspuffer zu 500  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auch die Stammlösungen wurden über längere Zeiträume gefroren gelagert.

#### Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Der PCR-Ansatz wurde kurz vor der PCR-Analyse aus folgenden Komponenten gemischt.

destilliertes Wasser	9 $\mu\text{l}$
Primer A (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
Primer B (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
zweifach kon. PCR-Puffer	25 $\mu\text{l}$
50%iges Tween 20 (v/v) <sup>2</sup>	1 $\mu\text{l}$
Probe in NS-Nährlösung	10 $\mu\text{l}$
DNA-Polymerase	1 $\mu\text{l}$

Es hat sich bewährt, zuerst das destillierte Wasser, die Primer, den Puffer, die zu analysierende Probe und zuletzt die Polymerase zu pipettieren, da sonst unerwünschte Konzentrationseffekte auftreten. Der fertiggestellte Reaktionsansatz wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Mineralöl überschichtet, in das PCR-Gerät (Thermocycler) eingesetzt und die Reaktion gestartet.

Die Reaktionszeit für die Denaturierung der DNA betrug 45 Sekunden bei  $94^{\circ}\text{C}$ , für das Annealing (Bindung der Primer) 60 Sekunden bei  $52^{\circ}\text{C}$  und für die Kettenverlängerung (Amplifikation) der DNA durch die Polymerase 90 Sekunden bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Die Reaktion wurde nach 35 Zyklen beendet.

#### Gelelektrophorese und Nachweis des Erregers durch das 0,9 Kb PCR-Produkt

Zur Auftrennung der PCR-Produkte im Agarose-Gel wurden folgende Lösungen benötigt:

#### Proben-Puffer

Der 10fach konzentrierte Proben-Puffer enthielt 200 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 50% Glycerin (v/v), 0,1% Bromphenol Blau, 0,1% Xylen-Cyanol und 0,1% Orange G.

#### Elektrophoresepuffer

Eine 40fach konzentrierte Stammlösung des Elektrophoresepuffers enthielt 193 g Tris, 14,32 g EDTA ad 11 und wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 7,6 eingestellt. Für die Elektrophorese wurde diese Stammlösung 1:40 mit Wasser verdünnt.

#### Agarose-Gel

Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarose-Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml Elektrophoresepuffer aufgenommen und die Lösung im Mikrowellenherd erhitzt, bis keine Trübung mehr sichtbar war. Nach Abkühlen auf etwa  $60^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank wurde mit dieser Lö-

<sup>2</sup>) Tween 20 unterstützt die Lyse intakter Bakterien während der Reaktion. Die Sensitivität der PCR-Analyse wird deutlich erhöht, ohne die Reaktion zu beeinträchtigen (BERESWILL et al., 1992).

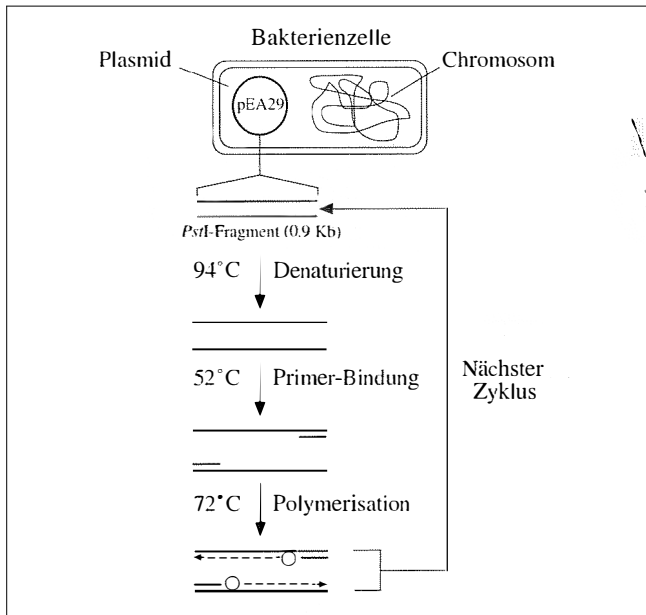


Abb. 2. Schematische Darstellung der Diagnose von *Erwinia amylovora* mit dem PCR-Verfahren.

sung ein Gel gegossen. Nicht verbrauchte Agaroselösung kann bei 60 °C für mehrere Tage aufbewahrt werden.

Nach 35 PCR-Reaktionszyklen wurden die Proben mit 5,5 µl 10× Proben-Puffer versetzt, in die Taschen des 1,5%igen Agarose-Gels eingefüllt und für 60 min bei 5–6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Leuchttisch bei 300 nm sichtbar gemacht. Die Präsenz einer 0,9-Kb-großen DNA-Bande im Gel zeigte die Anwesenheit des Feuerbrandenerregers in der Probe an. Andere PCR-Produkte (größer oder kleiner als 0,9 Kb) waren unspezifisch und können bei Analyse von Bakterien der Begleitflora auftreten (BERESWILL et al., 1992). Das Reaktionsprinzip der PCR-Analyse ist in Abbildung 2 zusammengefaßt.

### Ergebnisse und Diskussion

In Vorarbeiten (BERESWILL et al., 1993) konnte der Erreger unabhängig von der Art des untersuchten Gewebes in befallenen Blättern, in Rindenstücken von Cankern (abgestorbenen Rindenpartien an Stamm und Ästen) und in von Honigbienen gesammeltem Blütenpollen nachgewiesen werden (Abb. 3). Für den Nachweis von *Erwinia amylovora* in Obstanlagen wurden Blüten- und Blattproben in einer Streuobstanlage und in mehreren Erwerbsobstanlagen entnommen und mit dem Plattenverdünnungsverfahren (ZELLER und JÖST, 1987) und der PCR vergleichend untersucht. Bei diesem Monitoring war der Erreger über beide Versuchsjahre hin mit beiden Diagnoseverfahren an verschiedenen Kernobstsorten und Ziergehölzen nachweisbar (Tab. 1, 2). Mit Hilfe der PCR wurde der Erreger jedoch häufiger nachgewiesen als mit dem konventionellen Plattenausstrichverfahren. Dies ist wahrscheinlich auf die Sensitivität der PCR zurückzuführen. Im Versuchsjahr 1992 war zum Zeitpunkt der Hauptblüte des Kernobstes der Erreger nicht nachweisbar (Tab. 1), während im Folgejahr an einem anderen Standort das Bakterium sowohl in Blütenproben als auch in von Bienen gesammelten Pollen eindeutig detektiert werden konnte (Tab. 2). Aus den Witterungsdaten des Jahres 1991 konnte geschlossen werden, daß der Erreger nur ein geringes Inokulumpotential aufbauen konnte. Im Folgejahr war daher die Anzahl akti-

ver Canker während der Blühphase so gering, daß der Erreger nicht mehr nachweisbar war. Im Sommer 1992 traten jedoch Triebinfektionen auf, die im Herbst oft zur vermehrten Ausbildung von Cankern in den beobachteten Anlagen führten. Letztere sind offenbar im Frühjahr 1993 aktiv geworden und haben dann zu den starken Blüteninfektionen geführt, die vornehmlich am Apfel auftraten.

Aus zuletzt von uns durchgeführten Untersuchungen ging jedoch auch hervor, daß trotz sichtbarer Symptome in der Obstanlage der Erreger nicht nachzuweisen war (s. Tab. 1, für Proben vom 21. und 28. 7.). Dies war hauptsächlich bei trockener Witterung der Fall. Wurden die Proben jedoch unter feuchten Bedingungen gesammelt, so war die Anzahl positiver Proben deutlich höher. Es bleiben daher noch Fragen in Hinsicht auf die Verteilung des Erregers in Obstanlagen offen. Dies bezieht sich auf befallene Anlagen wie auch auf befallensgefährdete und noch nicht sichtbar infizierte Anlagen. Auch

Tab. 1. Nachweis des Feuerbrandenerregers durch die PCR-Analyse und das Verdünnungsverfahren auf Agarplatten an Kernobst und Weißdorn in der Streuobstanlage Ettlingen

Datum	positive Proben bei Analyse durch	
	Ausplattierung	PCR
21. 4.	0	0
28. 4.	0	0
4. 5.	0	0
12. 5.	0	0
19. 5.	0	0
26. 5.	1	1
1. 6.	3	2
10. 6.	2	1
16. 6.	0	3
23. 6.	1	2
29. 6.	0	3
5. 7.	0	2
13. 7.	2	4
21. 7.	0	0
28. 7.	0	0
4. 8.	0	1
11. 8.	0	1
18. 8.	0	1
25. 8.	0	1
8. 9.	0	3
15. 9.	0	3

Anzahl der Proben pro Anlage: 7; Versuchszeitraum: Vegetationsperiode 1992

Tab. 2. Nachweis des Feuerbrandenerregers durch die PCR-Analyse und das Verdünnungsverfahren auf Agarplatten in der Erwerbsobstanlage Grünwettersbach

Datum	positive Proben bei Analyse durch	
	Ausplattierung	PCR
26. 4.	1	1
3. 5.	2	3
10. 5.	2	4

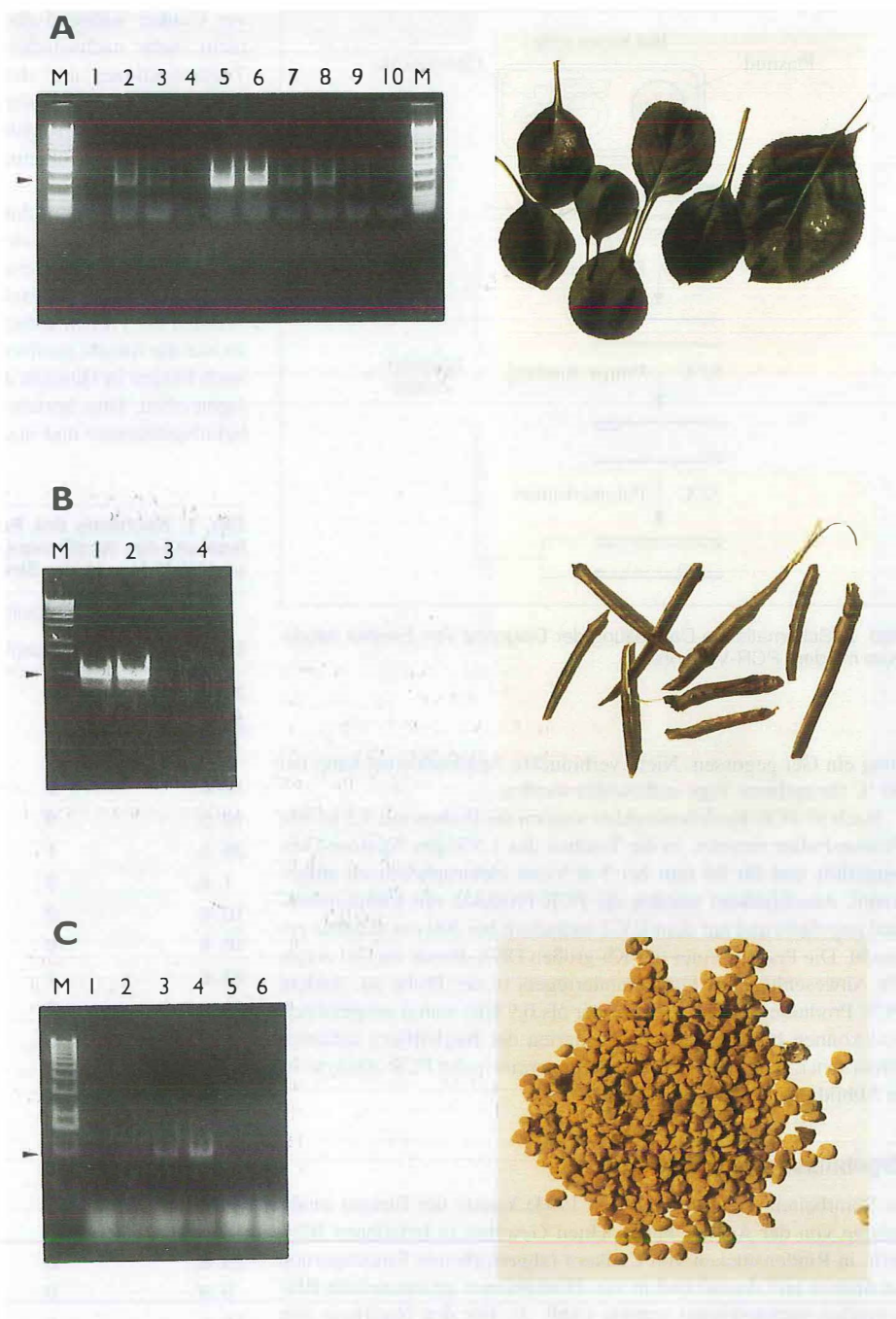
Anzahl der Proben pro Anlage: 8; Versuchszeitraum: Blühperiode 1993

Abb. 3. PCR-Detektion des Feuerbrand-Erregers in Pflanzenmaterial.

A) Blattmaterial: In den Spuren 1–9 wurde ein im Labor inokuliertes Blatt mit der PCR-Methode analysiert. Das Probenmaterial wurde steril entnommen und homogenisiert. Die Proben stammten aus einer Läsion (Spuren 1–3), aus dem Übergangsgewebe zwischen abgestorbenem und gesundem Gewebe (Spuren 4–6) und aus der symptomlosen Umgebung der Läsion (Spuren 7–9). Die Spuren repräsentieren Verdünnungsreihen des jeweiligen Proben-Homogenats. Spur 10 zeigt eine Kontrollreaktion ohne Probenmaterial.

B) Rinde: In den Spuren 1–2 wurden zentrifugierte Waschlösungen einer Überwinterungszone (Canker) von *Erwinia amylovora* in die PCR eingesetzt. Das 0,9 Kb große PCR-Produkt zeigt die Präsenz der Bakterien in der Rinde an. Ein gesundes Blatt eines anderen Triebes derselben Pflanze ergab kein Signal (Spuren 3 und 4).

C) Blütenpollen: Die Pollenproben wurden im Frühjahr 1992 während der Kernobstblüte von Bienenstöcken eingesammelt. Sie stammten von einem Kontrollfeld ohne Symptome (Spuren 1, 2, 5, 6) und von einem stark mit Feuerbrand kontaminierten Versuchsfeld (Spuren 3, 4). Für die Untersuchung mit der PCR wurden die Proben in sterilem Wasser gelöst und unverdünnt (Spuren 1, 3 und 5) bzw.  $10^{-1}$  verdünnt (Spuren 2, 4 und 6) in die Reaktion eingesetzt. Das Auftreten des 0,9 Kb PCR-Produkts zeigt *Erwinia amylovora* in Pollen aus dem stark kontaminierten Versuchsfeld an. Für Pollen aus dem Kontrollfeld wurde kein PCR-Signal erhalten. M bezeichnet Spuren, in denen Marker-DNA aufgetrennt wurde. Die Pfeile markieren DNA der Größen 1 Kb.



wenn mit Hilfe des von uns durchgeführten Monitorings mit dem PCR-Verfahren der Erreger meist nachzuweisen war, sind wegen der nicht gleichmäßigen Verteilung des Pathogens in der Anlage noch weitere Untersuchungen erforderlich, um z. B. über die Anzahl und Art von Stichproben eine möglichst gesicherte Diagnose in der Praxis zu ermöglichen.

#### Literatur

BERESWILL, S., A. PAHL, P. BELLEMANN, W. ZELLER, and K. GEIDER, 1992: Sensitive and Species-Specific Detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3522–3526.  
BERESWILL, S. und K. GEIDER, 1994: Die Anwendung der PCR für die Diagnose pflanzlicher Krankheitserreger. In: Wink, M., H. Wehrle (Hrsg.). PCR im medizinischen und biologischen Labor-Handbuch für den Praktiker, S. 154–165, GIT Verlag Darmstadt. 295 Seiten.

BERESWILL, S., F. BERGER, und W. ZELLER, 1993: Feuerbrand-Diagnose mit biologischen Methoden. *Gartenbaumagazin* **5**, 57–59.

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. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2798–2802.

MULLIS, K. B. and F. A. FALOONA, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335–350.

ZELLER, W., 1975: Anleitung zur Diagnose des Feuerbrandenerregers (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **27**, 20–22.

ZELLER, W. und M. JOST, 1987: Anleitung zum Monitoring des Feuerbrandenerregers (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **39**, 177–178.

Kontaktanschrift: Prof. Dr. Wolfgang Zeller, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim