

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Resistenzgenetik, Grünbach

## Gensonden zur Diagnose der Erreger von Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule – Molekulare Hybridisierung als Nachweismethode von *Erwinia carotovora*

Gene probes in diagnosis for black leg and soft rot causing bacteria – Molecular hybridization as a method for detection of *Erwinia carotovora*

Von H. Brüning und G. Wenzel

### Zusammenfassung

Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule der Kartoffel werden durch pektinolytische Bakterien der Gattung *Erwinia* verursacht. Für die Züchtung von Sorten mit genetisch verankerter Resistenz gegen *Erwinia* ist eine sichere Pathogendiagnose Voraussetzung. DNA-Hybridisierungs-Techniken erlauben heute den Nachweis von Bakterien. Es wurde bei drei *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*-Stämmen anhand der chromosomalen und Plasmid-DNA untersucht, auf welchem Wege sich die besten Gensonden für den Hybridisierungstest herstellen lassen.

### Abstract

Black leg and soft rot are caused in potato by bacteria of the genus *Erwinia*. A reliable diagnosis of the pathogen is a prerequisite for breeding varieties with genetically controlled resistance against *Erwinia*. Today DNA hybridization techniques allow diagnoses of bacteria. It was tested in chromosomal and plasmid DNA of three *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strains by which procedure optimal gene probes for the hybridization could be produced.

### Abkürzungen

Eca: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*,  
Ecc: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*,  
Ech: *Erwinia chrysanthemi*,  
PL: Pektatlyase.

Nach einem nassen Jahr wie 1987 deckt der Landwirt bei der Kartoffelernte sehr viele faule Knollen auf. Solche primär von der Naßfäule, später von anderen Krankheiten wie *Clostridium* ssp. und *Bacillus* ssp. befallenen Kartoffeln lassen ihn nach Bekämpfungsmaßnahmen rufen und geben Handel und Verbraucher Anlaß, die schlechte Qualität zu beanstanden. Der Kartoffelanbauer bekommt meist bereits erste Hinweise auf das Ausmaß der zu erwartenden Knollenkrankheit durch Stauden, die während der Wachstumsphase Schwärzungen an der Stengelbasis zeigen, die „Schwarzbeinigkeit“. Schwarzbeinigkeit und Knollennaßfäule sind eng gekoppelte Krankheiten, die in Abhängigkeit von Bodenbeschaffenheit und Niederschlagsmengen den Kartoffelbau belasten und vor allem im

Saatkartoffelbau erhebliche Einbußen bedingen. Die Ursache liegt in der Infektion durch Bakterien der Gattung *Erwinia*, die ihre Pathogenität primär durch den Abbau von Pektinbestandteilen der Zellwände entwickeln (PEROMBELON & KELMAN 1980). Da in der Bundesrepublik Deutschland keine Mittel zur chemischen Bekämpfung zugelassen sind, kann ein Bestand nur befallsfrei bleiben, wenn *Erwinia*-freies Pflanzgut verwendet wird. Für die Kontrolle der Befallsfreiheit sind sichere Testverfahren notwendig, mit denen sich die An- oder Abwesenheit der Bakterien an und in der Knolle möglichst quantitativ feststellen läßt.

Die Züchtung resistenter Sorten würde darüber hinaus die Möglichkeit eröffnen, den Befall von Kartoffeln mit *Erwinia* langfristig einzudämmen. Eine Voraussetzung für den Aufbau von Sorten mit genetisch verankerter Resistenz ist die Verfügbarkeit eines Tests, mit dem überprüft werden kann, wie groß die genetische Abwehrkraft der Kartoffelsorte ist, wenn die Bakterien z. B. durch Wunden in das Gewebe eindringen konnten. Auch dazu sollte ein quantitativer Test verfügbar sein. Für beide Testzwecke wäre es wünschenswert, auch die jeweilige Pathogenität des Erregerstammes genau zu kennen, so daß virulente und weniger virulente Typen identifiziert und differenziert werden können. Kennt man die Reaktion unterschiedlicher *Erwinia*-Stämme am gleichen Kartoffelklon, so kann man mit definierten *Erwinia*-Typen durch den Vergleich unterschiedlich resistenten Zuchtmaterials die noch unbekannt geneticalen Grundlagen der Resistenz gegen *Erwinia* aufdecken und züchterisch nutzen.

Pathogendiagnose erfolgt heutzutage vor allem noch durch „klassische“ Verfahren (Biotest mit Indikatorpflanzen, serologische, physiologische und andere mikrobiologische Methoden). Als neues Verfahren tritt zu diesen die Analyse der Nukleinsäure von Krankheitserregern. Serologie und noch stärker der Biotest beruhen auf Reaktionen, die – oft durch die Umwelt beeinflusst – mehr oder weniger späte Folgen des Nukleinsäureaufbaus sind; Diagnose auf der Nukleinsäurestufe liegt dagegen direkt auf der züchterisch entscheidenden genetischen Stufe. Bei dem Test auf An- oder Abwesenheit bestimmter Nukleinsäuren nutzt man die spezifische Bindung, die eine einzelsträngige Nukleinsäure mit einem komplementären zweiten einzelsträngigen Nukleinsäuremolekül eingeht. Die Festigkeit dieser molekularen Hybridisierung ist ein direk-

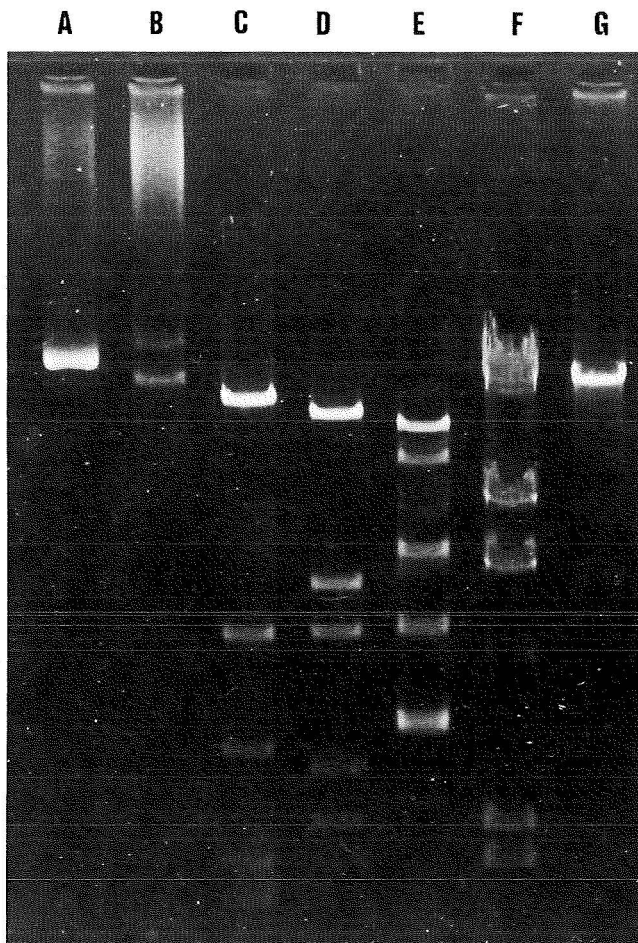


Abb. 1. Agarosegel (0,8 %) mit dem Plasmid pECA 185 aus *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* DSM 30185. A: „supercoiled“ Form; B: lineare und offene Ringform; C-G: geschnitten mit C: Bgl II, D: Hind III, E: Eco RI, G: Bam HI; F: Längenstandard  $\lambda \times$  Hind III.

tes Maß für die Übereinstimmung der DNA/DNA- oder RNA/DNA-Nukleotide. Die Pathogendiagnose durch molekulare Hybridisierung der Pathogennukleinsäure bedient sich dabei sogenannter „Gensonden“ (KESSLER 1986). Das sind klonierte DNA-Fragmente, die sich sehr spezifisch nur mit homologen Genomteilen, im speziellen Fall von *Erwinia* nur mit Eca-DNA paaren.

Da sich die Gattung *Erwinia* speziell durch die Fähigkeit zum Abbau von Pektinen als C-Quelle von fast allen anderen Bodenbakterien abhebt, wurde für die Diagnose von *Erwinia carotovora* als Sonde das Gen für die Pektatylase EC. 4.2.2.2, (PL), aus Eca kloniert.

### Methoden und Ergebnisse

#### Molekulare Hybridisierung

Der Weg zur Sonde führt über Isolierung und Klonierung von Eca-DNA, dabei wurde bei einem der Eca-Stämme (Eca 30185) erstmals ein Plasmid von 32kb gefunden (Abb. 1). Es gibt schon außerhalb der Gattung *Erwinia* Beispiele für sogenannte „Merodiploidie“ bei Bakterien. (Merodiploide tragen einen Teil des Chromosoms zusätzlich stabil auf einem Plasmid.) Dies kann durchaus Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Bakteriums haben, wie z. B. bei dem *trk A* Gen von *Escherichia coli*, das den Kaliumtransport beeinflusst (HAMANN & BAKKER 1987).

Durch ein Hybridisierungsexperiment wurde deshalb überprüft, ob auch das Eca-Plasmid pECA 185 hinsichtlich der Pektatylase einen Fall von Merodiploidie darstellt und für die Pektatylase und damit für das Krankheitsbild mitverantwortlich ist. Die DNA des Plasmids wurde mit Biotin markiert (Abb. 2) und gegen die Gesamt-DNA der pektinolytischen Eca-Stämme 30184 und 30186 (beide plasmidfrei) sowie 30185 (plasmidhaltig) nach dem Southern-Blot-Verfahren hybridisiert (LEARY et al. 1983). Das Resultat dieses Versuchs: Es wurde kein positives Hybridisierungssignal in den beiden plasmidfreien Eca-Stämmen gefunden. Somit scheidet die Möglichkeit, daß in dem Plasmid pECA 185 Merodiploidie vorliegt, aus, es trägt kein(e) PL Gen(e). Inwieweit aber dennoch plasmidkodierte Proteine eine Rolle in der Entwicklung der Pathogenität spielen, soll durch Subklonierung des Plasmids in *E. coli* geklärt werden. Erste Ergebnisse besagen, daß in pBR 322 und PBR 329 klonierte pECA-185-Fragmente in *E. coli* sehr instabil sind. Die *E.-coli*-Vektoren verlieren große Teile der Eca-DNA.

#### „Screening“ mit Ech-Gensonden

Für das Screening auf PL-Gene zur Konstruktion der Gensonde konnten inzwischen aus Ech klonierte PL-Gene eingesetzt werden, die von N. T. KEEN, für die Hybridisierungen zur Verfügung gestellt wurden (KEEN et al. 1984; KEEN & TAMAKI 1986). Damit ist es möglich, direkt im Genom von Eca nach homologen PL-Gen-Sequenzen zu suchen. Bei die-

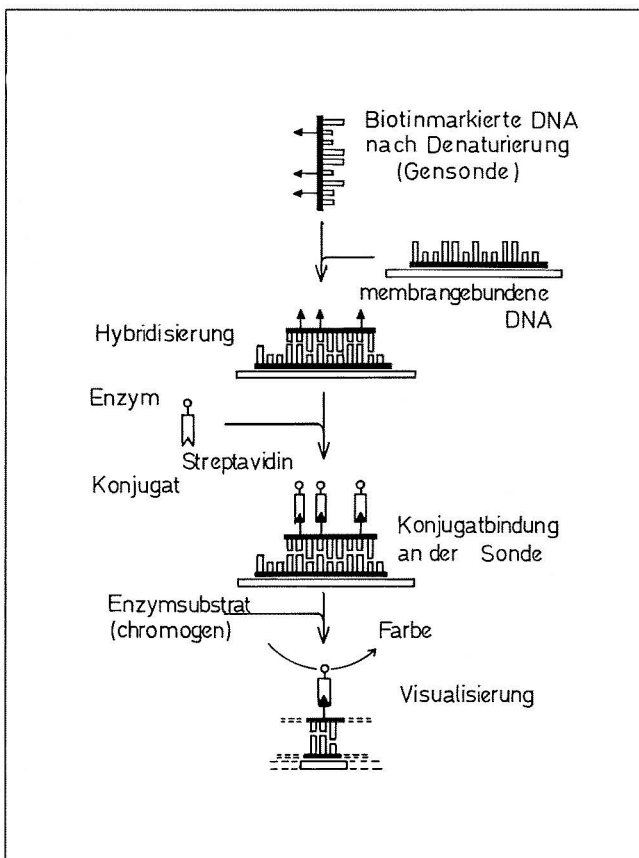


Abb. 2. Prinzip der Markierung, Hybridisierung und Detektion mit biotinylierten DNA-Sonden.

ser Art des Suchens durch Hybridisierung sind hier schwache Signale durchaus zu erwarten, da die Gattung *Erwinia* eine Sammlung recht heterogener pflanzenpathogener Bakterien darstellt (STARR 1981). Taxonomisch gesehen ist es gut möglich, daß *E. chrysanthemi* und *E. carotovora* nur entfernt miteinander verwandt sind.

In ersten Hybridisierungsexperimenten chromosomaler DNA von Eca 30184, 30185 und 30186 (jeweils mit dem Restriktionsenzym Pst I geschnitten) mit den PL-Genen aus Ech waren die erwarteten schwachen Signale vorhanden. Die Signale gebenden Banden lagen im Bereich von 2 bis 5 Kilobasen. Aufgrund dieser Ergebnisse werden nun die hybridisierenden Eca/Pst-I-Fragmente in pBR 329 kloniert. Aus den entstehenden Eca-Klonen kann die Gensonde dann so konstruiert werden, daß sie im Hybridisierungstest mit Proben von Kartoffelknollen, je nach der Befallsstärke durch *Erwinia*, deutliche Signale liefert.

### Diskussion

Mit diesem Test sollte es gelingen, den äußeren Befall von Knollen mit *Erwinia* sicher zu diagnostizieren. Da mit Sonden gegen das virulente Prinzip von Eca gearbeitet wird, werden nur virulente Stämme, die die tatsächliche Gefahr für den Kartoffelanbau darstellen, erfaßt. Die Messung des Titors virulenter Eca-Typen in der Knolle läßt Aussagen über die genetische Abwehrkraft nach einer Infektion zu. Ergeben sich hier entsprechend unterschiedliche Resistenzreaktionen, so kann mit klassischer oder unkonventioneller Züchtungsarbeit begonnen werden.

### Danksagung

Für die schnelle Überlassung der Ech-Gensonden, die uns Dr. N. T. KEEN (University of California, Riverside) zur Verfügung gestellt hat, danken wir Herrn Dr. A. NACHMIAS (Gilat Experiment Station, Israel). Für die Bereitstellung der Eca-Stämme und kritische Diskussion gilt unser Dank Herrn Dr. E. LANGERFELD, BBA Braunschweig. Die Arbeit wurde von der GFP als Teil des BMFT-Programms „Angewandte Biologie und Biotechnologie“ gefördert.

### Literatur

- HAMANN, A., E. P. BAKKER, 1987: Potassium transport in *Escherichia coli*, subcloning, physical mapping, and N-terminal sequence of the *trk A* gene; Posterpresentation, Frühjahrstagung der VAAM 1987, Konstanz.
- KEEN, N. T., D. DAHLBECK, B. STASKAWICZ, W. BELSER, 1984: Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**, 825–831.
- KEEN, N. T., S. TAMAKI, 1986: Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC 16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**, 595–606.
- KESSLER, C., 1986: Molekularer Nachweis von Erbkrankheiten, BIUZ **16**, 46–59.
- LEARY, J. J., D. J. BRIGATI, D. C. WARD, 1983: Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin labeled DNA-probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-Blots. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **80**, 4045–4049.
- PEROMBELON, M. C. M., A. KELMAN, 1980: Ecology of the soft rot *erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**, 361–387.
- STARR, M. P., 1981: The genus *Erwinia*, in “The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria”, (M. P. STARR, H. STOLP, J. H. TRÜPER, A. BALOWS, and H. G. SCHLEGEL, eds.). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1260–1271.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **40** (2), S. 19–21, 1987, ISSN 0027-7479.  
© Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde. Münster

## Untersuchungen über die Gefährdung von Kleinvögeln durch inkrustiertes Winterrapsaatgut

### Investigations of the hazard of small birds by pelleted rapeseed

Von Hubert Gemmeke

### Zusammenfassung

Im Spätsommer 1986 sind nach Aussaat von Winterraps tote Vögel gefunden worden. Die Todesursache wird auf inkrustierte Beizmittel zurückgeführt, durch die Kleinvögel schon bei Aufnahme weniger Saatkörner gefährdet sind. In Freilandversuchen wurde deshalb geprüft, ob Kleinvögel durch Farben und Repellentien in der Inkrustierung davon abgehalten werden, Rapskörner aufzunehmen. Die Versuche haben ergeben, daß die beobachteten Vögel (Grünfinken, Feld- und Hausperlinge, Kohlmeisen) durch keine der getesteten Farben und Repellentien davon abgeschreckt werden, Rapskörner aufzupicken. Eine Saatgutbehandlung mit diesen Mitteln allein

kann deshalb eine Vogelgefährdung nicht ausschließen. Bei der Ausbringung muß deshalb darauf geachtet werden, daß das Saatgut vollständig eingearbeitet bzw. mit Erde abgedeckt wird.

### Abstract

During late summer in 1986 dead birds were found on fields sown with rapeseed. Insecticide treated seed was supposed to be the reason, as small birds are endangered by only few seeds. We tested in field trials, if coloured seed or seed treated with repellents prevent birds from picking it up. In observations treatment could not deter birds (Greenfinches, Tree Sparrows, House Sparrows, Great Tits) to take it up. In this way it is not possible to exclude poisoning of birds.