

Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg

## Prüfung einer Population von Agrobakterien auf Sensibilität für das Bacteriocin des Antagonisten *Agrobacterium radiobacter* K 84\*)

Examination of a population of *Agrobacteria* for sensibility to the bacteriocin of the antagonist *Agrobacterium radiobacter* K 84

Von Susanne Nüsslein und D. Knösel

### Zusammenfassung

Zur Bekämpfung der Wurzelkropfkrankheit steht derzeit keine geeignete chemische Methode zur Verfügung. Daher hat die Bedeutung der Bakteriose in letzter Zeit wieder zugenommen, was insbesondere für das Baumschulgebiet in Schleswig-Holstein zutrifft, da zahlreiche Betriebe die Vermehrung und Anzucht anfälliger Rosengewächse betreiben. Um die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung, die auf dem Einsatz eines bakteriellen Antagonisten basiert, abschätzen zu können, war es angezeigt, die Sensibilität der Erregerpopulation für das Wirkungsprinzip zu testen. Die vermittels selektiver Nährmedien aus Bodenproben von Baumschulflächen und aus befallenen Pflanzen isolierten Agrobakterien gehörten verschiedenen Biotypen an. Die Prüfung auf Sensibilität für den antagonistischen Wirkstoff Agrocin verlief mit einer Ausnahme negativ. Der an Tomatenpflanzen durchgeführte Pathogenitätstest ergab einen Anteil von etwa 1% virulenter Isolate in der Agrobakterienpopulation.

### Abstract

There are no chemical measures which are effective enough to control crown gall diseases at the time being. Thus, the role of the bacteriosis has gained its importance recently, in particular in Schleswig-Holstein where susceptible *Rosaceae* are propagated and cultivated in many nursery farms. To achieve an assessment of biological control based on the use of a bacterial antagonist, it is necessary that the population of the pathogen should be tested for sensibility to the principle of efficiency. *Agrobacteria*, isolated from soil samples of nursery farms and from infected plants by using selective nutrient mediums, belong to different biotypes. Sensibility tests on the antagonistic active substance Agrocin turned out negative, with one exception. Pathogenicity tests on tomato plants showed a rate of ca. 1% of virulent isolates within the population of *Agrobacteria*.

In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology unterscheiden KERSTERS und DeLEY (1984) in der Gattung *Agrobacterium* Conn 4 Spezies (Tab. 1), die hauptsächlich anhand ihrer phytopathologischen Eigenschaften charakterisiert sind.

Andere Autoren haben anhand von Ergebnissen aus stoffwechselphysiologischen und biochemischen Untersuchungen

die Agrobakterien in Biotyp 1 und 2 eingeteilt, wobei der Aspekt der Pathogenität nicht entscheidend bewertet wird und die Biotypen sowohl pathogene als apathogene Formen enthalten (KEANE et al. 1970, WHITE 1972, KERSTERS et al. 1973, HOLMES und ROBERTS 1981). Aus befallenen Weinreben isolierte Agrobakterien nahmen in ihren physiologischen Eigenschaften eine Form von Zwischenstellung ein, und KERR und PANAGOPOULOS (1977) definierten einen Biotyp 3, der inzwischen auch an Chrysanthemen gefunden worden ist (BAZZI und ROSCIGLIONE 1982).

Von MIROW und KNÖSEL (1986) sind Isolate von *A. tumefaciens* aus dem Baumschulgebiet um Pinneberg differentialdiagnostisch untersucht worden, wobei physiologische Merkmale und die Sensibilität für Antibiotika bewertet wurden. Bei einer Einteilung gemäß SCHROTH et al. (1965) und NEW und KERR (1971) konnte Biotyp 1 als gewissermaßen vorherrschend aber auch Biotyp 2 nachgewiesen werden. Aufgrund abweichender Merkmale waren einige Isolate nicht einzuordnen. Der Versuch, auf einer Kulturfläche mit Erregervorkommen bei Anwendung der biologischen Bekämpfungsmethode nach NEW und KERR (1972) eine Reduktion des Befalles zu erzielen, verlief negativ. *In-vitro*-Tests ergaben, daß die Erregerstämme auf das Bacteriocin des Antagonisten nicht sensibel reagierten. Im Rahmen dieser Untersuchungen hatte

Tab. 1. Arten der Gattung *Agrobacterium* (nach KERSTERS und DeLEY, 1984) und deren Krankheitsbild

Spezies	Krankheitsbilder
1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith and Townsend) Conn	verursacht an über 600 Pflanzenarten aus 93 Familien Hypertrophien
2. <i>Agrobacterium radiobacter</i> (Beijerinck and van Delden) Conn	ist nicht phytopathogen, wird als saprophytisches in der Rhizosphäre von Pflanzen lebendes Bakterium angesprochen
3. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (Riker, Banfield, Wright, Keitt and Sagen) Conn	verursacht starke Proliferationen vor allem an den Wurzeln von Obstgehölzen (engl.: „hairy-root“)
4. <i>Agrobacterium rubi</i> (Hildebrand) Starr and Weiss	ist wirtsspezifisch und verursacht Tumoren nur an Rubusarten („Rutengallen“)

\*) Herrn Präsidenten Professor Dr. G. SCHUHMANN zum 65. Geburtstag gewidmet.

lediglich eine begrenzte Anzahl von Bakterienstämmen diesem Test unterzogen werden können, weshalb es angezeigt erschien, die Agrobakterien-Population des Baumschulgebietes auf breiterer Basis nochmals zu prüfen.

## Material und Methoden

### Isolierung der Agrobakterien

Entnahme der Bodenproben. Von Anbauflächen mehrerer Baumschulen, die sich mit der Anzucht wurzelkropfempfindlicher Rosengewächse befassen, wurden Proben mittels einer Schaufel bis zu etwa 20 cm Bodentiefe entnommen und bis zur Untersuchung kühl und trocken aufbewahrt.

Suspensionen der Bodenproben wurden auf der Oberfläche von Selektivnährmedien verteilt. Aufschwemmung von 10 g Boden in 100 ml NaCl-Lösung; 20 Min. Schütteln bei 120 U/Min.; 0,1 ml je Petrischale. Inkubation bei 26 °C, 4–5 Tage.

Zusammensetzung der Selektivnährmedien, jeweils auf 1 l aqua dest., für **Biotyp 1** nach SCHROTH et al. (1965): 20,0 g Agar, 10,0 g Mannitol, 4,0 g Natriumnitrat, 2,0 g Magnesiumchlorid, 1,2 g Calciumpropionat, 0,2 g Magnesiumphosphat, 0,1 g Magnesiumsulfat, 0,075 g Natriumbicarbonat, 0,075 g Magnesiumcarbonat, pH 7,1, 275 ppm Berberinsulfat, 100 ppm Natriumselenit, 60 ppm Penicillin G, 30 ppm Streptomycinsulfat, 250 ppm Cyclohexamid, 1 ppm Tyrothricin, 100 ppm Bacitracin. Nach BRISBANE und KERR (1983): 3,04 g Arabitol, 0,16 g Ammoniumnitrat, 0,54 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,04 g Dikaliumhydrogensulfat, 0,25 g Magnesiumsulfat, 0,29 g Natriumtaurocholat, 2,0 ml Chrystalviolett (1%ige wässrige Lsg.), 15,0 g Agar; 1,0 ml Cyclohexamid (2%ige Lsg.), 1,0 ml Natriumselenit (1%ige Lsg.).

Für **Biotyp 2** nach NEW und KERR (1971): 18,0 g Agar, 5,0 g Erythritol, 2,5 g Natriumnitrat, 0,1 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,2 g Calciumchlorid, 0,2 g Natriumchlorid, 0,2 g Magnesiumsulfat, 2,0 ml Eisen-EDTA (0,65%), 2,0 µg Biotin; pH 7,0; 250 ppm Cyclohexamid, 100 ppm Bacitracin, 1 ppm Tyrothricin, 100 ppm Natriumselenit. Nach BRISBANE und KERR (1983): 3,05 g Erythritol, 0,16 g Ammoniumnitrat, 0,54 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1,04 g Dikaliumhydrogenphosphat, 0,25 g Magnesiumsulfat, 0,29 g Natriumtaurocholat, 5,0 ml Malachitgrün (0,1%ige Lsg.), 1,0 ml Hefeextrakt (1%ige Lsg.), 15,0 g Agar, 1,0 ml Cyclohexamid (2%ige Lsg.), 1,0 ml Natriumselenit (1%ige Lsg.).

Von charakteristischen Kolonien (Tab. 2) wurde Material auf Tryptone-Soya-Agar übertragen. Die Kulturen sind bei 4 °C aufbewahrt und regelmäßig umgesetzt worden. Befallenes Pflanzenmaterial, Tumorgewebe, das noch nicht nekrotisch war, ist gesäubert, zerrieben und dann in NaCl-Lösung aufgeschwemmt worden. Als Nährsubstrat fand TS-Agar Verwendung.

### Bestimmung der Agrocinsensibilität

Von MIROW und KNÖSEL (1986) war die Methode nach STONIER (1960) benutzt worden. In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Anzucht von *A. radiobacter* K 84 ebenfalls in dem Basalmedium nach STONIER. Zusammensetzung: 1000 ml Aqua dest., 0,1 g Calciumsulfat, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,2 g Natriumchlorid, 2,7 g Ammoniumnitrat, 5,0 mg Eisennitrat, 0,1 mg Manganchlorid, 0,5 mg Zinkchlorid, 10,0 g Kaliumcitrat, 2,0 g Natriumglutamat, 1,5 mg Natriumdihydrogenphosphat, 4,4 mg Dikaliumhydrogenphosphat, pH 6,8.

In Anbetracht der Vielzahl zu testender Isolate ist unsererseits die Sensibilität dann nach Vorversuchen mittels eines Agardiffusionstestes wie folgt geprüft worden: in dem Basal-

medium wurde der Antagonist K 84 für 24 h bei 26 °C und 120 U/Min. kultiviert; aus der Kulturlösung die Bakterienzellen mittels Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße entnommen und das Filtrat bei 30 °C im Rotationsverdampfer auf ¼ Volumen eingeeengt, bis zum Gebrauch tiefgefroren. Von den frisch umgesetzten Bodenisolaten wurde Material entnommen, soweit möglich in gleichen Mengen, in NaCl-Lösung aufgeschwemmt und 10 ml verflüssigtem Glukose-Hefeextrakt-Agar in Petrischalen zugefügt. Nach Verfestigung sind jeweils 2 Löcher mit einem Bohrer gestanzt und 0,1 ml konzentriertes, agrocinhaltiges Filtrat einpipettiert worden. Die Inkubation erfolgte 72 h bei 26 °C zur Bonitur auf Hemmhöfe. Der hoch sensible Stamm *A. t.* 135 diente Kontrollzwecken. Eine weitere Kontrolle war möglich, indem in eines der Agarlöcher NaCl-Lösung pipettiert werden konnte.

### Pathogenitätstest an Tomatenpflanzen

Pflanzen der Sorte Vollendung wurden im Gewächshaus in Einheitserde angezogen, jede Woche flüssig gedüngt. Zur Inokulation sind mit einem Skalpell im Abstand von 5–8 cm vertikale Einschnitte in den Stengel gemacht worden, in diese wurden mit Bakteriensuspensionen getränkte Filtrierpapierstreifen eingebracht und die präparierten Wunden mit Parafilm umwickelt. Auf diese Weise konnten bis 4 Isolate je Pflanze getestet werden. Der hoch virulente Stamm *A. t.* Chrys. III diente der positiven Kontrolle. Die beginnende Tumorentwicklung ließ sich nach 14 Tagen erkennen; nach 4 Wochen waren ausgeprägte Tumoren vorhanden.

## Ergebnisse

Die Bodenproben hatten durchweg sandig-lehmigen Charakter. Auf den Anbauflächen waren so gut wie ohne Unterbrechung in der Fruchtfolge wurzelkropfempfindliche Pflanzen aufgezogen worden. Vorversuche hatten bereits gezeigt, daß auf allen vier selektiven Substraten charakteristische Bakterienkolonien zur Entwicklung gelangten. Es erwies sich lediglich als vorteilhaft, in den Medien nach BRISBANE und KERR (1983) auf das zunächst zugesetzte Streptomycin zu verzichten, da es sich zu stark hemmend auswirkte.

Anhand der Koloniedichte auf den verschiedenen Nährböden war erkenntlich, daß in den Böden wesentlich mehr Agrobakterien des Biotyps 1 als des Biotyps 2 vorhanden sind, was bereits von MIROW und KNÖSEL (1986) ermittelt worden war. Für die Prüfung der Bacteriocinsensibilität erschien es aber sinnvoll, über eine ausreichend hohe Anzahl beider Biotypen zu verfügen. Das Medium von SCHROTH et al. (1965) war für die Isolierung weniger ergiebig (Tab. 2). Insgesamt wurden 1036 Isolate gewonnen und getestet.

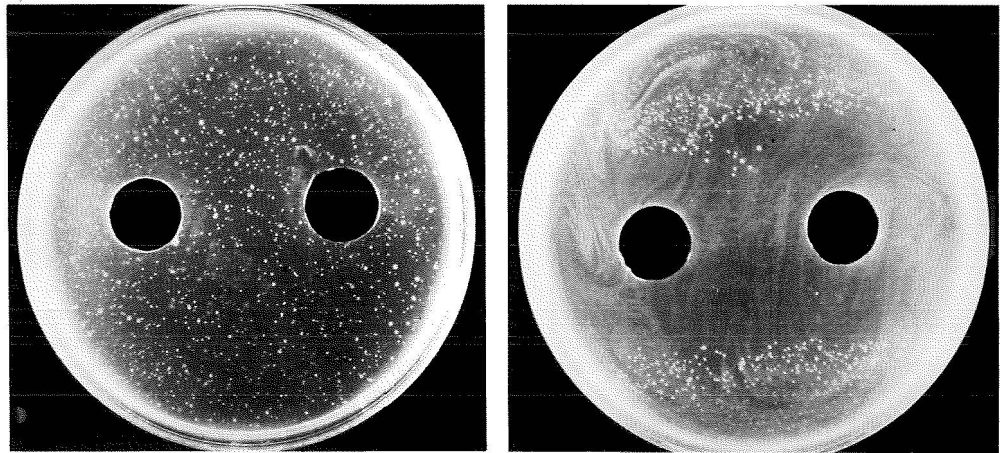
Bei jedem Ansatz zur Sensibilitätsprüfung reagierte der Vergleichsstamm 135 positiv mit deutlicher Ausbildung eines Hemmhofes (Abb. 1). Wurde anstelle des K 84-Konzentrates NaCl-Lösung einpipettiert, erfolgte das Wachstum gleichmäßig über die Gesamtagarplatte. Im Vergleich zu Stamm 135 zeigten sich die Hemmhöfe bei positiver Reaktion der Isolate in der Regel schwächer ausgeprägt und mit geringerem Durchmesser. Auffällig war, daß bei einem Anteil der nicht sensiblen Bakterien ein verstärktes Wachstum im Diffusionsbereich der Agarplatten auftrat. Dies war bei 6 % der Isolate der Fall. Bei einem weiteren Anteil war überhaupt nur im Diffusionsbereich Wachstum festzustellen.

Mit lediglich 79 sensiblen Bodenisolaten, das sind 7,6 %, muß deren Anteil als sehr niedrig bezeichnet werden. Dabei bestand ein gewisser Unterschied in bezug auf die zur Isolierung benutzten Selektivmedien. Es hatte allerdings den

Abb. 1. Agardiffusionstest mit agrocinhaltigem Kulturfiltrat von *Agrobacterium radiobacter* K 84. Nährsubstrat Glukose-Hefeextrakt-Agar, Inkubation 26 °C, 72 h.

Rechts: Standardstamm *A. tumefaciens* 135, ausgeprägter Hemmhof.

Links: Bodenisolat, negativ.



Anschein, daß einige Bakterien-Isolate mehrfach erfaßt worden waren. Der Anteil von Biotyp 1 lag mit 4,3 bzw. 5,8 % niedriger als der des Biotyps 2 mit 8,5 bzw. 9,6 %. Eine Beziehung zu den Anbauflächen oder den dort angezogenen Pflanzenkulturen zeichnete sich nicht ab (Abb. 2).

Eine Reihe definierter Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* ist gesondert geprüft worden. Es handelte sich um Organismen, die vom Seniorautor und von MIROW (1984) aus befallenen Pflanzen und Bodenproben isoliert worden waren, sowie um Vergleichsstämme, die Kollegen zur Verfügung gestellt hatten.

Wie aus Tabelle 3 zu ersehen ist, reagierten außer dem australischen Standardstamm 135 lediglich die Stämme Chrys. IIb und Z 369 sensibel. Die Herkunft dieser Organismen ist nicht das Baumschulgebiet.

Bei der Prüfung der Bodenisolat auf Pathogenität an Tomatenpflanzen war in Anbetracht ihrer Vielzahl eine auf-

wandmindernde Durchführung unvermeidbar. Es wurde von jeweils 4 Isolat Bakterienmaterial zu einer Suspension vereinigt und mit dieser die Inokulation nach der oben beschriebenen Methode vorgenommen. Wenn Tumorentwicklung auftrat, sind die Isolate nochmals einzeln inokuliert worden. An den Kontrollpflanzen war nach etwa 2 Wochen nach Inokulation mit Stamm Chrys. III die einsetzende Tumorbildung erkennbar und nach weiteren 2 Wochen ausgeprägte Tumoren vorhanden. Bei negativem Verlauf bildete sich an den Einschnittstellen im Tomatenstengel leistenförmig aus (Abb. 3). Es bestätigten sich die Angaben früherer Autoren, wonach nur eine geringe Anzahl im Boden vorhandener Agrobakterien virulent ist. Bei vorliegend untersuchten Bodenproben betrug der Anteil 1,2 %. Im Vergleich mit der vom Standardstamm Chrys. III ausgelösten starken Tumorbildung traten an den Inokulationsstellen mit Bodenisolaten zumeist nur kleinere Wucherungen auf.

Tab. 2. Charakteristische Eigenschaften der Kolonien von Agrobakterien auf den verwendeten Selektivnährböden und Anzahl der Isolate. Inkubation bei 26 °C

Medien	Form der Kolonien	Farbe der Kolonien	Anzahl der Isolate
SCHROTH et al. 1965 Biotyp 1	konvex, rund mit glattem Rand 2-4 mm Ø, 4 Tg	gelblich bis lachsfarben	94
NEW u. KERR 1971 Biotyp 2	s. o. 2-3 mm Ø, 6 Tg	weißlichgrau bis rehbraun mit perlartigem Glanz	318
BRISBANE u. KERR 1983 Biotyp 1	s. o. 2-4 mm Ø, 4 Tg	weißlich, dann rotbraun werdend	342
Biotyp 2	s. o. 2-3 mm Ø, 6 Tg	weißlich, dann rötlich werdend	282
			E x 1036

Tab. 3. Agrocinsensibilität definierter Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*, geprüft im Agardiffusionstest

Bezeichnungen	Autoren	Wirtspflanzen	Agardiffusionstest
A 8, A 12, A 16, B 12, B 15, B 18, B 37, B 38, B 40, B 41	MIROW	<i>Rosa</i> , <i>Malus</i> , <i>Choenomeles</i> , Boden	negativ
Chrys. I, II, III, C. S. Chrys. IIb	KNÖSEL	<i>Chrysanthemum</i> <i>Rosa</i> <i>Chrysanthemum</i>	negativ negativ positiv
Z 369, Z 371	ZELLER		positiv negativ
137, 198, 449, 481, 508	VOGELSÄNGER u. GRIMM	<i>Rubus</i> , <i>Malus</i> , <i>Prunus</i> , Boden	negativ
135	KERR	<i>Prunus persica</i>	positiv (Standardstamm)

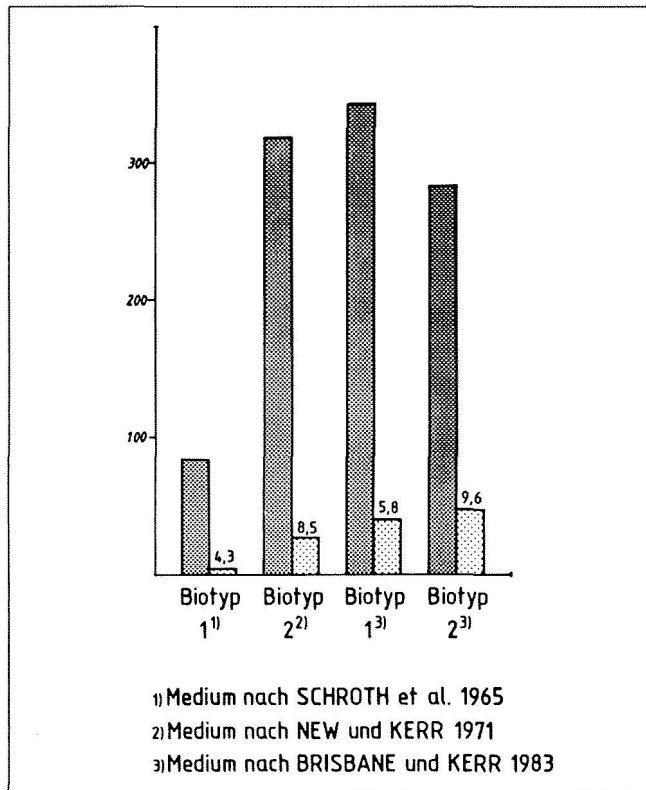


Abb. 2. Vergleichende Darstellung der Anteile agroinsensibler Bodenisolat unter Berücksichtigung der Biotopzugehörigkeit entsprechend den benutzten Selektivnährböden.

Es erschien angezeigt, die als virulent erkannten Isolate nochmals im Agardiffusionstest auf Sensibilität für Agrocin 84 zu testen. Die Auswertung mußte in 2 Fällen als nicht zweifelsfrei bezeichnet werden. Bleiben diese Isolate unberücksichtigt, so war in der Population von 1036 Bodenisolaten ein einziger virulenter und agroinsensibler Stamm, der dem Biotyp 2 zuzuordnen ist, enthalten (Tab. 4). Dieser ist aus der

Abb. 3. Pathogenitätstest an Tomatenpflanzen. Rechts: Einsetzende Tumorbildung 2 Wochen nach Inokulation mit *A. tumefaciens* Chrys. III. Links: Ausgebliebene Tumorbildung, negativ, Bodenisolat.



Bodenprobe Nr. 11 isoliert worden. Die Anbaufläche war mit Kartoffelfrosen (*Rosa rugosa*) bestanden.

Abschließend seien Modellversuche mit Chrysanthemen erwähnt, auf deren ausführliche Darstellung verzichtet werden muß, da die Ergebnisse unzureichend gesichert sind. Nach Vorbehandlung der Wurzeln mit dem Antagonisten K 84 waren die Pflanzen in Erde getopft worden, der Suspensionen virulenter Bakterien zugefügt waren. Nach sieben Wochen erfolgte die Bonitierung auf Tumorbildung. Die Befunde waren widersprüchlich, insbesondere in bezug auf die *In-vitro*-Ergebnisse. Eine teilweise oder gänzliche Unterdrückung der Tumorentwicklung war in einigen wenigen Fällen festzustellen, überraschenderweise aber auch verstärkte Tumorausbildung.

### Diskussion

Die Verhütung der Wurzelkropfkrankheit stößt nach wie vor auf Schwierigkeiten. Nachdem das bereits in den zwanziger Jahren von OPPENHEIMER (1926) entwickelte und bewährte Verfahren wegen der Verwendung von Quecksilber nicht mehr zugänglich ist und andere Wirkstoffe Mängel aufweisen (MIROW und KNÖSEL, 1987), konzentrieren sich die Untersuchungen verständlicherweise auf die von NEW und KERR (1971) erarbeitete Methode, basierend auf dem Einsatz eines bakteriellen Antagonisten. Wie die australische Forschergruppe nachweisen konnte, wirkt ein freigesetztes Bacteriocin inhibierend auf virulente Agrobakterien, was die Tumorbildung zu verhindern vermag. Für den erfolgreichen Einsatz in Australien und Neuseeland wird die homogene, hauptsächlich aus Biotyp 2 bestehende Erregerpopulation verantwortlich gemacht (MOORE und WARREN, 1979). Stämme dieses Biotyps sind bevorzugt für das Agrocin 84 sensibel (KERR und HTAY, 1974). An Standorten mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Biotypen sind der Wirksamkeit der Methode entsprechende Grenzen gesetzt. Europäische Autoren berichten über Befunde aus Griechenland (PANAGOPOULOS und PSALLIDAS, 1973), England (GARRETT, 1979), Schweiz (VOGELSÄNGER und GRIMM, 1983) und Spanien (LOPEZ et al., 1983), wonach der Anteil sensibler Stämme offenbar zwischen 7 und 100 % liegen kann. Allerdings sind die angewendeten Methoden nur mit gewissen Einschränkungen vergleichbar. Im Baumschulgebiet von Schleswig-Holstein treten Biotyp 1 und 2 sowie abweichende Isolate auf, wobei der Biotyp 1 vorherrscht. MIROW und KNÖSEL (1986) vermochten eine Agroinsensibilität nicht festzustellen. Diese Untersuchung bezog sich ausschließlich auf virulente Stämme und gab Anlaß, die Agrobakterienpopulation nochmals umfassend zu prüfen. Von den aus Wurzelbereichen anfälliger Pflanzen

Tab. 4. Ergebnisse der Prüfung auf Agroinsensibilität von als virulent nachgewiesenen Bodenisolaten

Nr. Bodenproben = Isolat	Biotyp	Befund im Agardiffusionstest
3	1	negativ
11	2	positiv
23	1	negativ
25	2	negativ
32	1	negativ
34	2	negativ
35	1	negativ
39	2	negativ
54	1	fraglich
60	1	fraglich
70	2	negativ

gewonnenen über eintausend Isolaten zeigten sich 7,6% im Agardiffusionstest für Agrocin 84 sensibel. Der Pathogenitätstest an Tomatenpflanzen wies davon nur einen Organismus als virulent aus. Stellt man das Merkmal der Pathogenität in den Vordergrund, so handelt es sich um einen *A. tumefaciens*-Stamm, während die übrigen nicht virulenten Isolate der Spezies *A. radiobacter* zuzuordnen sind. Auch BOUZAR et al. (1983) hatten Sensibilität bei avirulenten Stämmen vorgefunden. Demnach sind Agrocinsensibilität und Virulenz nicht unbedingt miteinander gepaart, wovon man ausgehen müßte, wenn die genetischen Informationen für beide Eigenschaften auf dem Ti-Plasmiden determiniert sind.

Für die Beobachtung, wonach bei nicht sensiblen Isolaten beim Agardiffusionstest mit Agrocin-Kulturfiltrat im Diffusionsbereich offenbar verstärktes Wachstum von Kolonien auftrat, dürfte eine Erklärung schwierig sein. Ein Nährstoffeffekt, ausgelöst von Resten im Kulturfiltrat, ist unwahrscheinlich. Wenn man berücksichtigt, daß in den erwähnten Modellversuchen verstärkte Tumorbildung festgestellt wurde, ist unter Umständen ein Fördereffekt auf diese nicht sensiblen Bakterien nicht auszuschließen. Es liegen aber auch Angaben von DU PLESSIS et al. (1985) vor, wonach *A. tumefaciens*-Stämme, die *in vitro* nicht reagierten, mit dem Antagonisten bekämpfbar waren. In diesem Zusammenhang bedarf es weiterer Untersuchungen.

Unsere Berechnung, wonach der Anteil virulenter Agrobakterien in der Bodenpopulation im Bereich von 1% liegt, entspricht den Angaben anderer Autoren wie KERR (1969). In Anbetracht fortwährend vorhandener Wirtspflanzen ist man geneigt, einen höheren Anteil zu erwarten. Seniorautor hat allerdings bei anderen bakteriellen Erregern vergleichbare Feststellungen gemacht. In den schweren Böden der Kohlanbauflächen auf der Filderebene und in Dithmarschen beispielsweise waren von vielen Isolaten von *Xanthomonas campestris* (*X. c. pv. campestris* (Pammel) Dowson) und von *Erwinia carotovora* (*E. c. subsp. carotovora* (Jones) Bergey et al.) ebenfalls nur überraschend wenige virulent. Von im Boden anzutreffenden Erregerpopulationen sind offenbar in der Regel nur einzelne Isolate virulent genug, um an Testpflanzen einen Infekt zu bewirken.

Abschließend ist in bezug auf die Bestrebungen zur Verhütung der Wurzelkropfkrankheit für das Baumschulgebiet zu folgern, daß für den erfolgreichen Einsatz des Antagonisten K 84 die Voraussetzung, nämlich die Agrocinsensibilität der Erregerpopulation, fehlt.

Die Autoren danken den Herren Kollegen Doz. Dr. W. ZELLER, Dr. J. VOGELSÄNGER, Dr. R. GRIMM für die Überlassung von Kulturen; Dr. J. SCHLISSKE für die Unterstützung vor Ort.

## Literatur

BAZZI, C., and ROSCIGLIONE, B.: *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3, causal agent of crown gall on *Chrysanthemum* in Italy. *Phytopath. Z.* **103**, 1982, 280–284.

BOUZAR, H., MOORE, L. W., and SCHAAD, N. W.: Crown gall on

pecan: a survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. *Plant Dis. Repr.* **67**, 1983, 310–312.

BRISBANE, P. G., and KERR, A.: Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. appl. Bact.* **54**, 1983, 425–431.

DU PLESSIS, H. J., HATTINGH, M. J., and VAN VUUREN, H. J. J.: Biological control of crown gall in South Africa by *Agrobacterium radiobacter* strain K 84. *Plant Dis. Repr.* **69**, 1985, 302–305.

GARRETT, C. M. E.: Biological control of crown gall in cherry rootstock propagation. *Ann. Appl. Biol.* **91**, 1979, 221–226.

HOLMES, B., and ROBERTS, P.: The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. *J. appl. Bact.* **50**, 1981, 443–447.

KEANE, P. J., KERR, A., and NEW, P. B.: Crown gall on stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* **23**, 1970, 585–595.

KERR, A.: Crown gall on stone fruit. I. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* and related species. *Aust. J. Biol. Sci.* **22**, 1969, 111–116.

KERR, A., and HTAY, K.: Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Path.* **4**, 1974, 37–44.

KERR, A., and PANAGOPOULOS, C. G.: Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopath. Z.* **90**, 1977, 172–179.

KERSTERS, K., DELEY, J., SNEATH, P. H. A., and SACKIN, M.: Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. gen. Microbiol.* **78**, 1973, 227–239.

KERSTERS, K., and DELEY, J.: Genus *Agrobacterium* Conn. 1942, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1, 1984, 244–254. Williams & Wilkins, Baltimore-London.

LOPEZ, M. M., MIRO, M., GORRIS, M. T., SALCEDO, C. I., TEMPRANO, F., and ORIVE, R. J.: Comparative efficiency of inoculation treatments with *Agrobacterium radiobacter* pv. *radiobacter* K 84 against sensitive and resistant Agrocin 84 strains of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. International workshop on crown gall. Wädenswill, 1983, 43–58.

MIROW, H.: Möglichkeiten der Bekämpfung des Wurzelkropfes an Baumschulgehölzen. Dissertation Universität Hamburg, 1984, 87 S.

MIROW, H. and KNÖSEL, D.: Differentialdiagnostische Untersuchungen von Erregerstämmen der Wurzelkropfkrankheit, *Agrobacterium tumefaciens*, in Zusammenhang mit Versuchen zur biologischen Bekämpfung. *Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz* **93**, 1986, 153–162.

MIROW, H., and KNÖSEL, D.: Untersuchungen zur Verbreitung des Wurzelkropf-Erregers, *Agrobacterium tumefaciens*, im Baumschulgebiet von Schleswig-Holstein und Versuche zur Bekämpfung. *Gesunde Pflanzen* **39**, 1987, 367–373.

MOORE, L. W., and WARREN, G.: *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Ann. Rev. Phytopath.* **17**, 1979, 163–179.

NEW, P. B., and KERR, A.: A selective Medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bact.* **34**, 1971, 233–236.

NEW, P. B., and KERR, A.: Biological control of crown gall: Field measurements and glasshouse experiments. *J. Appl. Bact.* **35**, 1972, 279–287.

OPPENHEIMER, H. R.: Verhütung und Heilung krebsartiger Pflanzengeschwülste. *Angew. Bot.* **8**, 1926, 8–29.

PANAGOPOULOS, C. G., and PSALLIDAS, P. G.: Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E. F. Smith a. Townsend) Conn. *J. Appl. Bact.* **36**, 1973, 233–240.

SCHROTH, M. N., THOMPSON, J. P., and HILDEBRANDT, D. C.: Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*Agrobacterium radiobacter* from soil. *Phytopath.* **55**, 1965, 645–647.

STONIER, T.: *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *J. Bact.* **79**, 1960, 889–898.

VOGELSÄNGER, J., and GRIMM, R.: Collecting bacterial strains from crown galls of apple rootstocks and identification of *Agrobacterium tumefaciens*. International workshop on crown gall. Wädenswill, 1983, 89–94.

WHITE, L. D.: The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to *Rhizobia* and other *Agrobacterium*. *J. gen. Microbiol.* **72**, 1972, 565–574.