

Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg

Direkt-Nachweis des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora* durch Birnentest mit Hilfe der Membranfiltration

Fast Diagnosis of Fireblight *Erwinia amylovora* by means of the Pear-Test and Membrane Filtration

Von D. Knösel

Zusammenfassung

Befallsverdächtiges Pflanzenmaterial wird zerkleinert und in Kochsalzlösung geschüttelt, daraus die Bakterien mittels Membranfilter separiert. Der bakterientragende Filter wird auf Schnittflächen von Birnenfrüchten aufgebracht. Die Inkubation erfolgt bei 23 °C; die Auswertung nach 2–4 Tagen, im positiven Falle haben sich charakteristische Schleimtropfen gebildet. Die Methode ist besonders geeignet für Institutionen, die nicht über bakteriologische Laboreinrichtungen verfügen. Eine Kultivierung der Bakterien auf künstlichen Nährsubstraten ist nicht erforderlich.

Abstract

Material from plants suspected of being infected is shredded and shaken in salt solution, therefrom the bacteria are separated by membrane filtration. The filter bearing the bacteria is placed on slices of pear fruits. Evaluation after 2–4 days of incubation at 23 °C. In case of positive reaction characteristic slimy drops have appeared. This method may be suitable for laboratories without complete bacteriological equipment. Cultivation of the pathogen on artificial media is not required for diagnosis.

Die Isolierung von Erregern aus erkranktem Pflanzengewebe wird in der Regel vermittels geeigneter Nährsubstrate durchgeführt. Unter günstigen Voraussetzungen, wenn der Organismus

charakteristische Wachstumsmerkmale aufweist, dürfte es möglich sein, ihn von der Begleitflora abzugrenzen. Häufig ergeben sich diesbezüglich Schwierigkeiten, was zur Entwicklung selektiver Substrate anregte, die aufgrund ihrer Zusammensetzung und Handhabung den gewünschten Organismus fördern oder die Begleitflora hemmen. Was die Feuerbrandkrankheit anbelangt, ist eine Reihe spezieller Nährsubstrate für den Erregernachweis beschrieben worden, die auch mit Erfolg angewendet werden. Die Tabelle gibt einen Überblick.

Zur endgültigen Beweisführung ist ein Pathogenitätstest anzuschließen. Für *Erwinia amylovora* sind zu diesem Zweck verschiedene Wirtspflanzen herangezogen worden, unter anderem *Cotoneaster*-Sorten, Apfel-, Birnensämlinge. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung von Birnenfrüchten, die unter Kühlung recht lange Zeit bereitgehalten werden können. In der Regel wird Bakterienmaterial, das man von den Nährbodenplatten entnimmt, in das Fruchtfleisch inokuliert oder auf Schnittflächen verstrichen. Nach Inkubation zeigen typische Schleimtropfen einen positiven Befund an. Von KLEINHEMPEL et al. (1975) sind vereinfachte Stücke befallverdächtigen Materials in die Birnenfrucht eingepflanzt worden. Zusätzlich oder alternativ kann das Bakterium serologisch bestimmt werden. Zusammenfassende Darstellungen des Feuerbrandproblems siehe ZELLER (1985) und BAUMM (1985).

Tab. 1. Übersicht der für den Nachweis des Feuerbranderregers entwickelten selektiven Nährsubstrate

Autoren	Bezeichnung	Anmerkungen
LELLIOTT 1968	Nutrient-Saccharose-Agar	Hoher Saccharosegehalt hemmt die Pilzentwicklung und bewirkt bei <i>Erwinia</i> - und <i>Pseudomonas</i> -Arten Produktion von Laevan, das als Schleim ausgeschieden die Oberflächenkolonien halbkugelig und typisch opaleszierend erscheinen läßt. Verwechslungsmöglichkeit mit <i>Ps. syringae</i> .
KADO und HESKETT 1970	D 3-Agar	Auf dem Substrat entwickeln sich <i>Erwinia</i> -Arten gut. Der Farbstoffumschlag erfolgt bei Weichfäuleerregern schnell, bei <i>E. amylovora</i> erst nach 48 Stunden. Nachteilig ist die starke Verpflanzung des Mediums, die eine Weiterkultivierung der Bakterien erschwert.
MILLER und SCHROTH 1972	Substrat mit Farbstoff-, Cyclohexamid- und Sorbitolzusatz	Nährsubstrat zeichnet sich durch geringe Verpflanzung und deutliche Farbreaktion bei <i>Erwinia</i> aus. Durch Sorbitol wird die Entwicklung von <i>E. herbicola</i> gehemmt. Substrat besonders für Monitoring geeignet.
CROSSE und GOODMAN 1973	Saccharose-Agar	Infolge extrem hohem Saccharose-Gehaltes wird das Wachstum stark verzögert. Die Kolonien von <i>E. amylovora</i> zeigen bei Vergrößerung unter seitlicher Beleuchtung typische Krater.
KLEINHEMPEL et al. 1975	Tetrazolium-Thiuram-Agar (TTA)	Substrat enthält ebenfalls einen hohen Saccharoseanteil. Die Erregerkolonien färben sich rot. Das Fungizid soll die Verpflanzung unterbinden.
HAHN 1980	TTN-, TCBP-Agar	Hier handelt es sich um eine Weiterentwicklung des TTA-Agars; das Wachstum der Erregerkolonien ist verbessert.
BRULEZ und ZELLER 1981	Nutrient-Saccharose-Agar mit Farbstoff- und Fungizidzusatz	Substrat ist für Monitoring gut geeignet

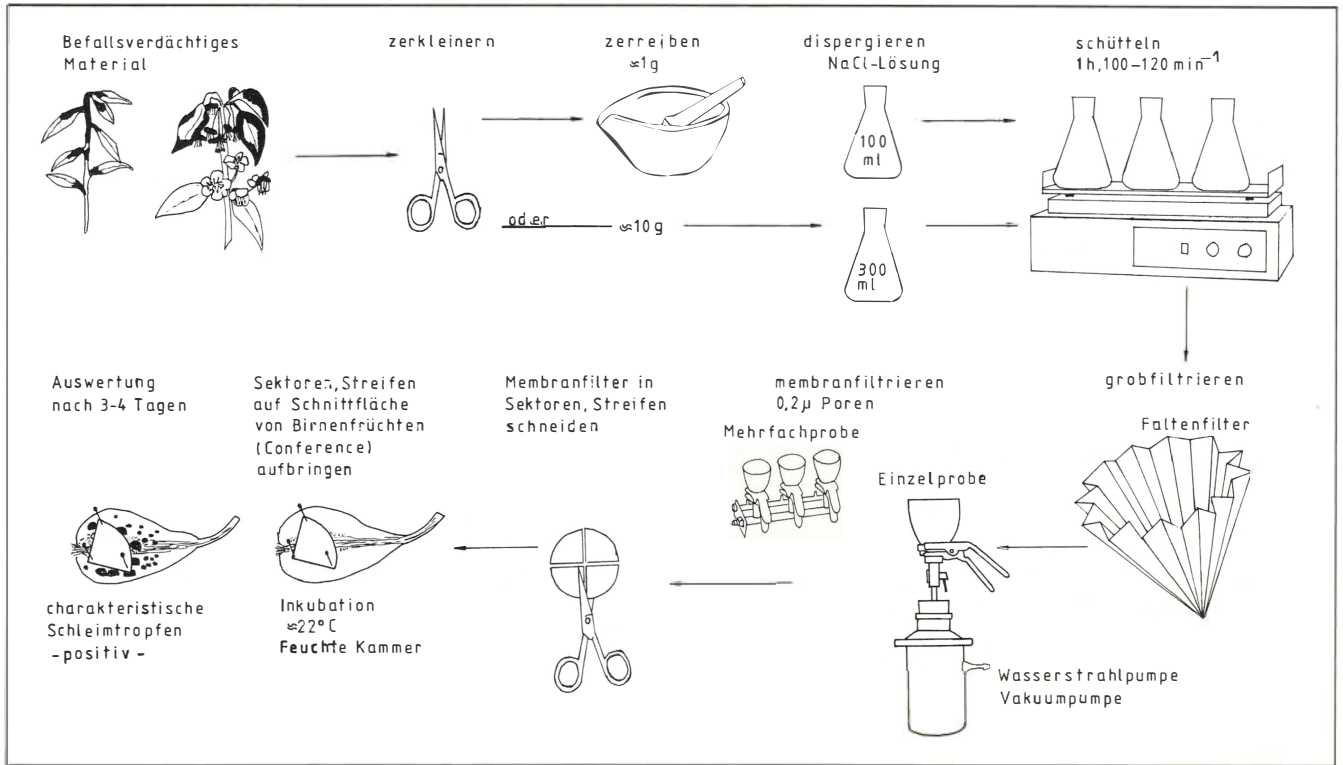


Abb. 1. Schematische Darstellung des Nachweisverfahrens.

In Anbetracht, daß in Befallsjahren mit dem Anfall zahlreicher Untersuchungsproben zu rechnen ist, erschien es angezeigt, Versuche vorzunehmen mit dem Ziel, einen sicheren und kurzfristigen Nachweis mit wenig Aufwand zu erreichen, ein Verfahren, das auch in nicht komplett eingerichteten Labors durchführbar ist.

Beschreibung der Methode

Bei der Probenahme von befallsverdächtigen oder zu kontrollierenden Pflanzen ist davon auszugehen, daß abgestorbenes und vertrocknetes Gewebe kaum lebende Bakterien enthalten kann. Die gänzlich trockenen Triebspitzen zu verwenden, ist beispielsweise wenig ratsam, vielmehr ist es angezeigt, Material aus der Übergangszone, also noch saftführendes Gewebe zu entnehmen. Wenn bis zur Untersuchung eine gewisse Zeit anfällt oder auch längerer Transport erforderlich ist, sollten angefeuchtetes Filtrierpapier und Plastiktüten eine weitere Austrocknung verhindern. Die Aufbewahrung soll bei etwa 4°C erfolgen. Zur Untersuchung wird das Material mit einer Schere zerkleinert, je nachdem, wieviel zur Verfügung steht, werden dann 1 g oder 10 g abgewogen und in Kolben mit 100 bzw. 300 ml Kochsalzlösung eingebracht. Bei 1-g-Einwaage empfiehlt es sich, das Material im Mörser oder einer Schale zu verreiben. Die Kolben werden auf eine Schüttelmaschine gebracht und bei 100–120 U/Min. etwa eine Stunde geschüttelt. Unter Verwendung von Faltenfiltern ausreichender Größe oder Watte werden die Pflanzenteile abgetrennt und aus dem Filtrat mittels Membranfilter mit 0,2 µ Porengröße die Bakterien entnommen. Das Filtrationsgerät ist an eine Vakuum- oder an eine Wasserstrahlpumpe anzuschließen. Der Membranfilter kann in Streifen oder Sektoren zerschnitten werden und ist mit der bakterientragenden Seite auf die

Schnittfläche halbiert Birnenfrüchte aufzubringen, anzudrücken und zu befestigen. Die Inkubation der Birnenfrüchte erfolgt bei 21–23°C in feuchter Kammer. Falls erforderlich müssen die aufliegenden Filter mit NaCl-Lösung nachgefeuchtet werden. Alle Handhabungen sind unter sterilen Kautelen vorzunehmen.

Positiver Befund liegt vor, wenn sich die typischen, leicht gelblich verfärbten Schleimtropfen des Erregers bilden, was bereits nach 2 Tagen der Fall sein kann; sofern das Gewebe nur relativ wenige virulente Bakterien enthalten hat, können 3–4 Tage vergehen.

Während der Sommermonate bis in den Oktober des Jahres 1984 sind zahlreiche Proben feuerbrandverdächtigen Materials aus dem Stadtgebiet von Hamburg, aus dem Pinneberger Baumschulraum und dem Alten Land nach der beschriebenen Methode untersucht worden. Es hat sich um verschiedene Wirtspflanzen gehandelt, nämlich *Cotoneaster*-, Apfel-, Birnensorten und Weißdorn. Anfangs wurde zu Vergleichszwecken eines oder zwei der in der Tabelle aufgeführten Selektivsubstrate parallel zur Erregerkultivierung eingesetzt. Nachdem sich weitgehende Übereinstimmung ergeben hatte, sowohl was positive als auch negative Befunde anbetrifft, durfte das Filterverfahren als sichere Nachweismethode angesehen werden.

In einer Vorversuchsreihe war geprüft worden, ob die Notwendigkeit bestand, die Begleitflora auszuschalten oder zumindest zu hemmen. Es wurden der Schüttellösung entsprechende Substanzen zugesetzt. Zuvor waren Stämme des Erregers, die von verschiedenen Wirtspflanzen stammten, auf Sensibilität gegenüber einer Reihe von Antibiotika getestet worden. Die Reaktion war recht einheitlich, so daß einige Antibiotika, die auf *E. amylovora* nicht wirksam waren, in Konzentrationen bis 200 ppm der Schüttellösung beigelegt werden konnten, zusammen mit Cyclohexamid als Pilzhemmer. Es hatten sich keine verbessernde Effekte gezeigt. Offensichtlich wirkt sich die Begleitflora beim Birnentest dieser Form also nicht sehr störend aus.

Die Methode eignet sich, in abgewandelter Form, auch zum Nachweis des Wurzelkropf-Erregers im Boden, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll.

Literatur

BAUMM, L. H., 1985: Praxisorientierte Untersuchungen zum Auftreten der Feuerbrandkrankheit (*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al.) im Obstanbaugebiet an der Niederelbe. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.
BRULEZ, W. und W. ZELLER 1981: Seasonal changes of epiphytic *Erwinia amylovora* on ornamentals in relation to weather conditions and the course of infection. *Acta Horticulturae* **117**, 37–43.
CROSSE, J. E., and R. N. GOODMAN, 1973: A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **63**, 1425–1426.

HAHN, W., 1980: Verbesserte Diagnose des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al.). *Archiv Phytopathol. Pflanzensch.*, Berlin, **16**, 361–367.
KADO, C. J., and M. G. HESKETT, 1970: Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* **60**, 969–976.
KLEINHEMPEL, H., G. WOLF, D. BEYME, H.-J. SCHAEFER und W. FICKE, 1975: Methoden der Diagnose von Obstbakteriosen. *Archiv Phytopathol. Pflanzensch.*, Berlin, **11**, 19–29.
LELLIOTT, R. A., 1968: The diagnosis of fireblight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. E.P.P.O Publ. Ser. A 45-E, 27–34.
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.
ZELLER, W., 1985: Untersuchungen zur Feuerbrandkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. Habilitationsschrift, Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **38** (6), S. 83–85, 1986, ISSN 0027-7479.
© Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Pflanzenschutzamt des Landes Schleswig-Holstein, Kiel

Epidemisches Auftreten der Ringfleckenkrankheit an Kohl in Schleswig-Holstein, verursacht durch *Mycosphaerella brassicicola* (Duby) Lindau

Ring-Spot-Disease on Cabbage in Schleswig-Holstein (Federal Republic of Germany) – An Epidemical Disease

Von M. Rudnick

Zusammenfassung

Während der Vegetationsperiode 1985 fiel in Schleswig-Holstein vornehmlich an Weiß- und Rotkohl eine Blattfleckenkrankheit auf, die bis dahin in dieser Häufigkeit und Stärke nicht aufgetreten war. Untersuchungen ergaben, daß es sich dabei um die von *Mycosphaerella brassicicola* (Duby) Lindau verursachte Ringfleckenkrankheit handelte. Zum Zeitpunkt der Schadensfeststellung im September ließen sich drei voneinander unterscheidbare Flecken-, „Typen“ ermitteln. Eine Identifizierung bereitete zunächst Schwierigkeiten, da die unterschiedlichen Symptome mehrere pilzliche Schaderreger vermuten ließen. Der Befall auf den Kohlköpfen war derart stark, daß durch zusätzliches Abblatten die Erntearbeiten erschwert worden sind. Die Gefahr einer Ausbreitung dieser Krankheit auf dem Lager wurde mit dieser Maßnahme allerdings nicht gebannt, da der Pilz mehrere Blattlager durchdrungen hatte.

Abstract

In 1985 cabbage was infested by the Ring-spot-disease, caused by *Mycosphaerella brassicicola*. The first attack was detected on white

and red cabbage in 1977, but to a small extent only. This disease has obviously not been detected since 1977. The first scattered symptoms were once again detected in July 1985. In September the same year the epidemic was manifested on white and red cabbage (Brussels sprouts and cauliflower sporadic). Three "types" of spots have been found, which made it rather difficult to make a diagnosis in the field: Type 1 – on senescent leaves: spots round or elliptic, approximate 20 mm, blackish, without sharp margins, near to the centre dark tubercles, pseudothecia with non-infectious spermatia ("pyncospores", see DRING).

Type 2 – on senescent leaves: typical ringspots with perithecia.
Type 3 – on headleaves: spots irregular or angular formed, sometimes with water-soaked areas, darkblue coloured leaf-nerves; neither pseudothecia nor perithecia, only pseudothecia with spermatia were isolated in the laboratory.

Epidemiological points of view.

Hitherto, it appears that this disease may not have any importance to rape. New researches explain, that *Mycosphaerella brassicicola* is probably not able to infect rape and can only infect cabbage cultures (KRÜGER).

All in all probably the concentrated, intensive cabbage-growing and ploughing of harvest-residues have supported the accumulation of inoculum.

High humidities, rain and low temperatures during the vegetation provided opportunity for infections (WELCH et al.). 1985 in Schleswig-Holstein the weather was unsettled from June to September: cool and rainy.