

**Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt
für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem**



**Wissenschaftliche Tagung
über den Feuerbrand
Ladenburg, 13.-14. Juni 1991**

bearbeitet von
Dr. habil. Wolfgang Zeller

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenschutz im Obstbau
Dossenheim

Heft 282

Berlin 1992

*Herausgegeben
von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Berlin-Dahlem*

Kommissionsverlag **Paul Parey**, Berlin und Hamburg
Seelbuschring 9-17, D-1000 Berlin 42

ISSN 0067-5849

ISBN 3-489-28200-0

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Wissenschaftliche Tagung über den Feuerbrand <1991, Ladenburg>:

Wissenschaftliche Tagung über den Feuerbrand: Ladenburg, 13. – 14. Juni 1991 / bearb. von Wolfgang Zeller. Hrsg. von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. – Berlin; Hamburg : Parey [in Komm.], 1992

(Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem; H. 282)

ISBN 3-489-28200-0

NE: Zeller, Wolfgang [Bearb.]; Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft < Berlin; Braunschweig > :

Mitteilungen aus der ...

© Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funk-sendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der Fassung vom 24. Juni 1985 zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungs-pflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

1992 Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, Seelbuschring 9-17, D-1000 Berlin 42
Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, 1000 Berlin 62

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
W. Zeller: Vorwort.....	7
Tagungsprogramm.....	8
M. Rudnick: Die Feuerbrandkrankheit in Schleswig- Holstein - Anfänge der Krankheit, Situation heute.....	10
E.-K. Krebs: Stand der Verbreitung des Feuerbran- des im Dienstgebiet der Landwirt- schaftskammer Hannover und Gegenmaß- nahmen.....	12
H. Graf: Zur Feuerbrand-Situation im Alten Land.....	13
M. Seidel: Zur Verbreitung und Abwehr des Feuer- brandes in Mecklenburg-Vorpommern.....	16
J. Dalchow: Stand der Verbreitung des Feuerbrandes in Hessen und Maßnahmen zur Bekämpfung nach der Feuerbrand-Verordnung.....	23
K. Falch: Situation des Feuerbrandes im Saarland und Maßnahmen zu seiner Bekämpfung.....	24
L. Gündel: Die Feuerbrandkrankheit in Rheinland- Pfalz.....	25
H.-G. Michel: Zur Situation des Auftretens der Feuer- brandkrankheit (<i>Erwinia amylovora</i>) in Baden-Württemberg.....	26
J. Vogelsanger und R. Grimm: Feuerbrandrisiko während der Blütezeit von Wirtspflanzen.....	29
M. Nachtigall: Ein Modell zur Überwachung des Feuer- brandes beim Kernobst.....	33
F. Ehrig: Ein Bakteriensammler zum Nachweis von <i>E. amylovora</i> in Obstanlagen.....	39
W. Zeller: Erfahrungen mit neueren bakteriziden Verbindungen gegen den Feuerbrand (<i>Erwinia amylovora</i>).....	44
J. Mosch und W. Zeller: Zur Wirkung von Pflanzenex- trakten gegen den Feuerbrand <i>Erwinia</i> <i>amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.....	48
K. Naumann und R. Gierz: Chancen und Grenzen einer Biologischen Bekämpfung des Feuerbran- des mit Hilfe bakterieller Antagonisten.	54
M. Sadowska-Rybak, und D. Knösel: Nachweis des Feuer- branderregers (<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.) mit Hilfe des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	59

B. Steinbrenner, W. Zeller, K. Geider und P. Bellemann: Zum Nachweis des Feuerbranderregers <i>Erwinia amylovora</i> durch DNA-Hybridisierung.....	62
S. Bereswill, A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller, und K. Geider: Nachweis und Analyse von <i>Erwinia amylovora</i> mit Hilfe von PCR und RFLP.....	65
K. Geider: Faktoren für die Wechselwirkung von <i>Erwinia amylovora</i> mit Pflanzen.....	69
P. Bellemann, F. Bernhard, M. Metzger und K. Geider: Die Rolle von Exopolysacchariden bei <i>Erwinia amylovora</i>	73
G. Geier und K. Geider: Die Levansucrase als Virulenzfaktor bei der Feuerbrandentstehung....	78
K. Richter: Feuerbrandresistenzprüfung bei Apfel-Ziergehölzen.....	82
W. Zeller: Untersuchungen zur Resistenz von Apfel- und Birnensorten gegen den Feuerbrand (<i>Erwinia amylovora</i>).....	88
C. Fischer: Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegenüber Feuerbrand an Apfel.....	96
F. Persiel: Stand der Resistenzzüchtung gegen die Feuerbrandkrankheit, <i>Erwinia amylovora</i> (Burr.) Winslow et al., bei <i>Cotoneaster</i>	107
Teilnehmerverzeichnis.....	111

SYMPOSIUM ON FIREBLIGHT, Ladenburg 13-14 June 1991

C O N T E N T S		page
W. Zeller:	Preface.....	7
	Program.....	8
M. Rudnick:	Fireblight in Schleswig-Holstein - First occurrence of the disease, present situation.....	10
E.-K. Krebs:	Distribution of fireblight in the area of Hannover' and measures of control.....	12
H. Graf:	Fireblight situation in the fruit growing area of "Altes Land".....	13
M. Seidel:	Distribution and control of fireblight in Mecklenburg-Vorpommern.....	16
J. Dalchow:	Distribution of fireblight in Hessen and measure of control according the fireblight-legislation.....	23
K. Falch:	The situation of fireblight in Saarland and measures of control.....	24
L. Gündel:	Fireblight in Rheinland-Pfalz.....	25
H.-G. Michel:	Occurrence of fireblight disease (Erwinia amylovora) in Baden-Württemberg.....	26
J. Vogelsanger and R. Grimm:	Fireblight risk of host-plants during blossom period.....	29
M. Nachtigall:	A warning system for fireblight on pome fruits.....	33
F. Ehrig:	Bacteria collector for the detection of Erwinia amylovora in orchards.....	39
W. Zeller:	Experiences with new bactericides against fireblight (Erwinia amylovora)....	44
J. Mosch and W. Zeller:	On the effect of plant extracts against Fireblight (Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al).....	48
K. Naumann and R. Gierz:	Chances and limits of the biological control of fireblight by antagonistic bacteria.....	54
M. Sadowska-Rybak and D. Knösel:	Diagnosis of the fireblight pathogen (Erwinia amylovora) with ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).	59

B. Steinbrenner, W. Zeller, K. Geider and P. Bellemann:	62
Identification of fireblight (<i>Erwinia amylovora</i>) with DNA-Hybridization.....	
S. Bereswill, A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller and	65
K. Geider:	Identification and analysis of <i>Erwinia amylovora</i> with PCR and RFLP.....
K. Geider:	Factors for the interaction of <i>Erwinia amylovora</i> with plants.....
P. Bellemann, F. Bernhard, M. Metzger and K. Geider:	73
The role of Exopolysaccharides for <i>Erwinia amylovora</i>	
G. Geier and K. Geider:	78
Levansucrase as a virulence factor for fireblight development.....	
K. Richter:	82
Procedure for the testing of apple cultivars and ornamentals on fireblight resistance.....	
W. Zeller:	88
Studies on the resistance of apple and pear varieties against fireblight (<i>Erwinia amylovora</i>).....	
C. Fischer:	96
Results on apple resistance breeding against fireblight.....	
F. Persiel:	107
The present state of breeding for resistance to fireblight, <i>Erwinia amylovora</i> (Burr.) Winslow et al. in the genus <i>Cotoneaster</i>	
List of participants.....	111

VORWORT

Aufgrund der zunehmenden Gefährdung des Kernobstbaus im süddeutschen Raum durch den Feuerbrand - mehrere vom Erreger stark befallene Birnen- und Apfelanlagen mußten in letzter Zeit in der Südpfalz und Baden-Württemberg gerodet werden - wurde vom Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der Biologischen Bundesanstalt eine wissenschaftliche Tagung über die Krankheit in Ladenburg veranstaltet. Dabei sollten zum einen die von dem Pflanzenschutzdienst der Länder durchgeführten Maßnahmen gegen die Bakteriose erörtert sowie ein Situationsbericht zu der bisherigen Ausbreitung des Erregers in der Bundesrepublik gegeben werden. Infolge der geplanten verschärften EG-Richtlinien beim Export von Wirtspflanzen des Erregers gewinnt dieser Tagungspunkt zusätzlich an Aktualität. Zum anderen sollte eine Orientierung über die bisher und in letzter Zeit durchgeführten Forschungen mit der Bakteriose ermöglicht werden. Die behandelten Fragestellungen, die in dem vorliegenden Mitteilungsband zusammengefaßt sind, reichen über Studien zur Epidemiologie, Bekämpfung und Resistenz der Krankheit bis zu gentechnologischen Arbeiten, die sich mit neueren molekularbiologischen Techniken zur Diagnostik und Virulenz des Erregers befassen. Das Ziel der Bestandsaufnahme 20jähriger Beschäftigung mit dem Erreger, zu der erstmals auch die Kollegen aus Ostdeutschland und der Schweiz über ihre umfangreichen Erfahrungen beitrugen, ist es, zu einem besseren Verständnis der Krankheit zu gelangen, um damit der Praxis letztlich Hilfestellung für ihre Kontrollmaßnahmen geben zu können.

Den Abschluß der Tagung bildete die Besichtigung von Versuchen, die z.Zt vom Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der BBA auf einer 30 km entfernt liegenden Versuchsanlage für den Feuerbrand durchgeführt werden.

Für die freundliche finanzielle Unterstützung der Tagung sei an dieser Stelle der Gesellschaft der Freunde und Förderer der BBA (GFF) besonders gedankt.

Dr. habil. Wolfgang Zeller

Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenschutz im Obstbau

WISSENSCHAFTLICHE TAGUNG ÜBER DEN FEUERBRAND

Tagungsort: Großer Domhofsaal des Rathauses Ladenburg

Donnerstag, den 13. Juni 1991

Begrüßung von Dr. habil. W. Zeller, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim

1. Sektion: Verbreitung und Gegenmaßnahmen

Krebs, K., Hannover: Zum Feuerbrand-Auftreten in Norddeutschland

Graf, H., Jork: Zur Feuerbrand-Situation im Alten Land
Seidel, Mechthild, Rostock: Zur Verbreitung des Feuerbrandes in Mecklenburg-Vorpommern und durchgeführte Abwehrmaßnahmen

Dalchow, J., Frankfurt: Stand der Verbreitung des Feuerbrandes in Hessen und Maßnahmen zur Bekämpfung nach der Feuerbrand-Verordnung

Falch, Karen, Saarbrücken: Situation des Feuerbrandes im Saarland und Maßnahmen zur Bekämpfung

Gündel, L., Mainz: Die Feuerbrandkrankheit in Rheinland-Pfalz
Michel, H.-G., Stuttgart: Zur Feuerbrand-Situation in Baden-Württemberg

Vogelsanger, J., Wädenswil: Feuerbrand in der Schweiz

2. Sektion: Epidemiologie

Nachtigall, Marion, Aschersleben: Ein Modell zur Überwachung des Feuerbrandes

Lösing, H., Pinneberg: Feuerbrand-Prognose per EDV-Erfahrungen in Schleswig-Holstein

Ehrig, F., Aschersleben: Ein Bakteriensammler zum Nachweis von *E. amylovora* in Obstanlagen

Vogelsanger, J., Wädenswil: Feuerbrandrisiko während der Blütezeit von Wirtspflanzen

3. Sektion: Bekämpfung

Zeller, W., Dossenheim: Erfahrungen mit neueren bakteriziden Verbindungen gegen den Feuerbrand (*Erwinia amylovora*)

Mosch, Janina und Zeller, W., Darmstadt und Dossenheim: Zur Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora*)

Naumann, K., Aschersleben: Chancen und Grenzen einer biologischen Bekämpfung des Feuerbrandes mit Hilfe bakterieller Antagonisten

Freitag, den 14. Juni 1991

4. Sektion: Diagnose

Rybak, Malgozeta, Hamburg: Nachweis von E. amylovora mit Hilfe von ELISA und Immunofluoreszenz (IMF)
Steinbrenner, B. und Zeller; W., Dossenheim: Nachweis von E. amylovora durch DNA-Hybridisierung
Pahl, A., Heidelberg: Nachweis und Analyse von Erwinia amylovora mit Hilfe von PCR und RFLP

5. Sektion: Physiologie und Genetik

Geider, K., Heidelberg: Faktoren für die Wechselwirkung von Erwinia amylovora mit Pflanzen
Bellemann, P., Heidelberg: Die Rolle von Exopolysacchariden bei der Ausbreitung von Erwinia amylovora
Geier, G., Heidelberg: Die Levansucrase als Virulenzfaktor bei der Feuerbrandentstehung

6. Sektion: Resistenz

Richter, K., Aschersleben: Feuerbrandresistenzprüfung bei Apfel und Ziergehölzen
Zeller, W., Dossenheim: Resistenzprüfung gegen den Feuerbrand bei Apfel und Birne
Fischer, Christa, Dresden-Pillnitz: Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegenüber Feuerbrand beim Apfel
Persiel, Friedegunde, Ahrensburg: Stand der Resistenzzüchtung bei Cotoneaster
Lösing, H., Pinneberg: Cotoneaster und Pyracantha-resistente Sorten in der Praxis

ENDE DES VORTRAGSTEILS

Exkursion zu der Feuerbrand-Versuchsanlage "Kirschgartshausen" der BBA

ENDE DER ARBEITSTAGUNG

M. Rudnick

Pflanzenschutzamt des Landes Schleswig-Holstein, Kiel

Die Feuerbrandkrankheit in Schleswig-Holstein - Anfänge der Krankheit, Situation heute

Die ersten Feuerbrandbefallsherde wurden am 27. August 1971 auf der Insel Sylt festgestellt, und damit erfolgte gleichzeitig der erste Nachweis des Erregers in der Bundesrepublik. Schon 14 Tage vorher hatte der dänische Pflanzenschutzdienst an der Westküste Nordschleswigs zwischen Tönder und Ribe an den dort sehr verbreiteten Weißdornhecken mehrfach stärkere Feuerbrandvorkommen entdeckt. Nach der Feststellung des Erstbefalls auf Sylt fanden Suchtrupps in der nordfriesischen Marsch und auf der Insel Nordstrand in einem verhältnismäßig schmalen Küstenstreifen nur Streubefall. Der Befall dehnte sich auf die Inseln Föhr und Pellworm aus. Auch an einzelnen Orten der Halbinsel Eiderstedt wurde der Erreger festgestellt. Das übrige Schleswig-Holstein blieb 1971 befallsfrei.

Trotz konsequent durchgeführter Rodungen von befallenen Wirtspflanzen, wie Weißdorn und Birne, dehnte sich der Befall aus und verdichtete sich innerhalb der vorjährigen Befallsgebiete. 1972 wurden drei kleine Befallsstellen auf der Insel Fehmarn festgestellt. Bereits 1972 wurden im Pinneberger Baumschulgebiet Weißdornhecken und einzelne Weißdornpflanzen gerodet, die näher als 200 m um Baumschulen standen. Diese Maßnahme diente der vorbeugenden Beseitigung möglicher Infektionsquellen für die weitere Übertragung der Feuerbrandkrankheit.

Die örtliche Ausbreitung der Krankheit schritt weiter fort. 1974 waren bereits einige Gemeinden in den Kreisen Schleswig-Flensburg und Rendsburg-Eckernförde befallen. Bei den Kontrollen im alten Befallsgebiet an der Westküste zeigte sich häufiger, daß in den Vorjahren erkrankte Crataegus-Pflanzen im Berichtsjahr symptomlos blieben. Ein Zusammenhang zwischen dieser Beobachtung und der extremen lang anhaltenden Trockenheit im Jahre 1975 ist zu vermuten. Es bestätigte sich erneut die Feststellung aus den Vorjahren, daß stärker geschädigte Crataegus-Pflanzen sich nahezu völlig regenerierten. Bei befallenen Birnbäumen konnten derartige Erscheinungen nicht beobachtet werden. In einigen Baumschulen des Pinneberger Baumschulgebietes trat 1975 die Feuerbrandkrankheit überraschend an Cotoneaster-Arten

- fast ausschließlich der Unterart *C. salicifolius floccosus* - und *Pyracantha* auf. Die infizierten Pflanzen wurden sofort vernichtet und dabei die gesunden Pflanzen der Umgebung mit erfaßt, um die Infektionsherde nachhaltig zu tilgen.

Auf den Versuchsanlagen Föhr, Borsbüll und Joldelundfeld erfolgten seit dem Jahr 1974 erste Untersuchungen über die Feuerbrandkrankheit. Das Institut für Phytopathologie der Universität Kiel nutzte die Versuchsanlage Föhr zu Untersuchungen über den Einfluß von Witterungsfaktoren auf die Epidemiologie der Krankheit. Auf der Versuchsanlage Borsbüll wurde der Befallverlauf an den wichtigsten Arten und Sorten anfälliger Obst- und Ziergehölze unter natürlichen Infektionsbedingungen verfolgt. Künstliche Infektionen wurden auf der Versuchsanlage Joldelundfeld an einem ähnlichen Wirtspflanzen-Sortiment vorgenommen. Die wissenschaftliche Auswertung dieser Vorhaben erfolgte durch die Institute für Bakteriologie und Obstkrankheiten der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Die Bundesforschungsanstalt für gartenbauliche Pflanzenzüchtung prüfte auf der Versuchsanlage Joldelundfeld Neuzüchtungen von *Cotoneaster* in einem frühen Auslesestadium auf Toleranz bzw. Resistenz gegen die Feuerbrandkrankheit mit Hilfe künstlicher Infektionen.

Bis gegen Ende der 70er Jahre hatte sich die Krankheit weiter östlich ausgebreitet. Im Gebiet Gettdorf-Eckernförde-Kiel konnte sich der Befall teilweise weiter verdichten. Auch im Kreis Ostholstein wurde die Feuerbrandkrankheit nachgewiesen. Besonders auffällig wurden jetzt stärkere Infektionen an Apfel. Dabei zeigte sich deutlich, daß befallene Weißdornpflanzen in unmittelbarer Umgebung von Apfelanlagen den Infektionsdruck erheblich erhöhen.

Inzwischen hat sich die Feuerbrandkrankheit über das gesamte Gebiet von Schleswig-Holstein ausgebreitet. In den letzten Jahren war das Auftreten der Bakteriose eher unauffällig. Zur Untersuchung gelangten aus dem Bereich von Kleingärten und öffentlichen Grünflächen überwiegend Ziergehölze der Gattung *Cotoneaster*. Im Baumschulgebiet werden in einem Umkreis von 5 km um Baumschulflächen kultivierte und wild wachsende Wirtspflanzen des Feuerbranderreger intensiv überwacht.

E.-K. Krebs

Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover

Stand der Verbreitung des Feuerbrandes im Dienstgebiet der Landwirtschaftskammer Hannover und Gegenmaßnahmen

Die Feuerbrandkrankheit wurde im Dienstgebiet der Landwirtschaftskammer Hannover erstmals 1973 festgestellt. Befallen waren Weißdornhecken an der Unterelbe, die als Windschutz dienten. In den folgenden Jahren verbreitete sich der Feuerbrand im Küstenstreifen zwischen Bremerhaven und Cuxhaven, um dann auch im Inneren des Elbe-Weser-Dreiecks an Weißdorn Fuß zu fassen. Da dieses Feldgehölz besonders häufig in den Flußtäälern der Aller, Leine und Weser zu finden ist und hier offenbar günstige infekti-onsfördernde Klimabedingungen herrschen, setzte sich die Bakteriose in den genannten exponierten Lagen im Laufe der 80er Jahre fest.

Dieses rasche Umsichgreifen der Feuerbrandkrankheit erforderte umfangreiche Kontrollmaßnahmen. In den Obstanbaugebieten des Alten Landes und der Winsener Elbmarsch übernahmen die Obstbauberatungsringe diese Aufgaben. Die Feuerbrandkontrollen in den Baumschulen, im öffentlichen Grün und in Privatgärten führen Mitarbeiter des Pflanzenschutzamtes Hannover durch. Alle Baumschulen werden zu diesem Zweck jährlich speziell begangen oder auch im Rahmen der Obstviruskontrollen auf Wirtspflanzen des Feuerbrandes und möglichen Befall inspiziert. Darüber hinaus werden Befallserhebungen auch in der Umgebung von Baumschulen im Sinne des gezielten Objektschutzes vorgenommen.

Zwecks Absicherung der Diagnose werden befallsverdächtige Zweigproben im Labor eingehend untersucht. Mit Hilfe von Direktisolierungen auf NSA, von serologischen Verfahren und durch Pathogenitätstests an unreifen Birnenfrüchten der Sorte 'Conference' erfolgt die Identifizierung.

Nennenswerter Befall trat in den Baumschulen, im öffentlichen Grün und in Privatgärten an großblättrigen, aufrechtwachsenden Felsenmispeln auf. Als Indikatorpflanze kann *Cotoneaster salicifolius floccosus* bezeichnet werden. Zunehmend wird beobachtet, daß Baumschulen auf den Anbau von hochanfälligen Ziergehölzen verzichten.

Generell werden befallene Pflanzen völlig vernichtet. Im Fall von *Crataegus* als Infektionsquelle für gefährdete Objekte wird allerdings mit Rücksicht auf die Belange des Naturschutzes in den meisten Fällen von Rodungen abgesehen. Statt dessen erfolgt ein starker Rückschnitt bis weit in das gesunde Holz hinein.

H. Graf

Obstbauversuchsanstalt Jork

Zur Feuerbrand-Situation im Alten Land

Die Feuerbrand-Situation im Jahre 1990

Das Jahr 1990 war durch eine außerordentlich starke Ausbreitung des Feuerbrandes gekennzeichnet. Ausgangspunkt dafür dürfte neben der Witterung in der Tatsache zu suchen sein, daß ein sehr früher Vegetationsbeginn vorlag und neu gepflanzte Apfelanlagen, insbesondere der Sorten 'Jonagold' und 'Elstar', die nach dem Kalender normal, nach dem Stand der Vegetation aber sehr spät gepflanzt wurden, auch sehr spät zur Blüte kamen. Insgesamt kann rückwirkend betrachtet ein Zeitraum von rund zwei Monaten für die Apfelblüte gerechnet werden, wobei sich die letzten Blüten, nämlich die der frisch gepflanzten Bäume, mit der Blüte vom Weißdorn überschneiden. Dieser ist leider noch in viel zu großer Anzahl im Anbaubereich zu finden und in aller Regel zumindest latent vom Feuerbrand befallen. Anhaltend günstige Witterungsperioden, also warm und feucht, führten zu einer ungewöhnlichen Vermehrung und Verbreitung, so daß am Ende der Vegetationsperiode von einem flächendeckenden Befall gesprochen werden konnte. Dabei wurden sowohl Apfel- als auch Birnenbäume befallen.

Die Feuerbrand-Situation 1991

Auch im Folgejahr setzten sich die Nachfragen über einen möglichen Befall fort. In aller Regel handelte es sich bei den eingesandten Apfelproben um Frostschäden, oft gekoppelt mit Befall durch Obstbaumkrebs (*Nectria galligena*) an der Stammverlängerung. Schwarz verfärbte Blütenbüschel waren sekundär von *Botrytis cinerea* und Hefepilzen befallen, so daß es schwierig war, diesen Befall vom Feuerbrand abzugrenzen. Es fehlte die für die Bakteriose typische Rotverfärbung des Holzes und der milchige, klebrige, fädenziehende Schleim. Auf der anderen Seite war die Rinde oft noch hell und intakt, obwohl der Holzkörper dunkel verfärbt war, auch in größerer Entfernung von der Krebsnekrose. Anfang Juni konnte dann aber der Erreger nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um aktive "hold over canker" im Bereich

des Stammholzes älterer Birnenbäume. Seit Anfang Juni wurden zunehmend Blütenbüschel von Birnenbäumen eingesandt, die allgemein zunächst als Frostschaden eingestuft wurden, aber einwandfrei als Feuerbrand angesprochen werden konnten.

Maßnahmen zur Eindämmung des Feuerbrandbefalls

Mit Hilfe von Rundschreiben, Durchsagen des automatischen Anrufbeantworters und Veranstaltungen unter der Leitung der Obstbauberater wurden die Praktiker unverzüglich über das verstärkte Auftreten des Feuerbrandes informiert. In diesem Zusammenhang wurden auch Hinweise und Empfehlungen zum Ausschneiden, zur Beseitigung des Schnittholzes, zur Desinfektion der Schnittwerkzeuge und zur Beachtung der Witterung beim Ausschneiden gegeben, wie sie schon seit Jahren von uns ausgegeben werden.

Rückblickend war festzustellen, daß der sofortige Rückschnitt, differenziert nach Apfel und Birne, durchaus in der Lage war, die weitere Ausbreitung sowohl innerhalb des Baumes als auch innerhalb der Anlagen zu begrenzen. Praktiker, die aufgrund der Erdbeer- und/oder Kirschenernte nicht ein sofortiges Ausschneiden durchführen konnten, mußten allerdings die zunehmende Ausbreitung zur Kenntnis nehmen. Nur ein erheblich verstärkter Einsatz von Arbeitskräften und ein sehr viel stärkerer Rückschnitt, auch beim Apfel, war in der Lage den Befall auszumerzen.

In diesem Zusammenhang wäre beispielhaft auf zwei besonders großflächige Rodungsmaßnahmen von Weißdornbeständen hingewiesen. Zum einen handelte es sich um einen Zusammenschluß mehrerer Obstbauern, die in einer Gemeinschaftsaktion Hecken entlang von Wirtschaftswegen im Außendeich von Kehdingen beseitigten. Bei der zweiten Aktion wurde mit Hilfe eines Beraters die Feuerwehr - Mitglieder größtenteils Obstbauern - eingesetzt, um auf einer Elbinsel (Hahnhöfersand) mehrere hundert Meter Weißdornhecken zu beseitigen. Beide Maßnahmen zeigen, daß mit dem entsprechenden Einsatz eine Beseitigung auch größerer Befallsherde durchaus zu erreichen ist.

Besonderheiten beim Auftreten von Feuerbrand in 1990

In der Liste der Feuerbrandwirtspflanzen ist auch die Vogelbeere (Sorbus) aufgeführt. Seit ca. 10 Jahren, in denen der Feuerbrand im Alten Land vorhanden ist, war an Sorbus kein Be-

fall nachzuweisen. Trotz einer großen Probenzahl gelang uns der Nachweis erst im Sommer 1990 an Alleebäumen, sowohl von *Sorbus intermedia* als auch *S. aucuparia*, die beide Schleimbildung, vertrocknete Blütenbüschel und Blattbüschel zeigten. Der anschließend durchgeführte Birnentest ergab ein positives Resultat, ebenso eine eingesandte Probe an das Pflanzenschutzamt Hannover.

Wenn auch von der Vogelbeere prinzipiell eine Gefährdung ausgeht, so ist diese aufgrund der Erfahrungen der letzten Jahre nicht mit der des Weißdorns zu vergleichen. Andererseits kann die Vogelbeere aber für die Zukunft bei der Suche nach dem primären Infektionsherd nicht unberücksichtigt bleiben.

Das zweite überraschende Ergebnis ergab sich aus Meldungen von Obstbauern im Raum Guderhandviertel. Sie beobachteten an der Unterlage M9, veredelt mit 'Holsteiner Cox', 'Jonagold' bzw. 'Jonagored' und 'Elstar', zum Teil mit Zwischenveredlung, zunächst eine sehr frühe Laubverfärbung an der Unterlage zum Rot hin mit anschließender Nekrosenbildung, die sehr dem Kragenfäulesymptom (*Phytophthora cactorum*) ähnelten. Diese Nekrose zeigte im Anschnitt ein öldurchtränktes Aussehen mit deutlicher Rotverfärbung und unterscheidet sich damit deutlich von der Kragenfäule. Hinzuweisen ist noch auf die Tatsache, daß der Feuerbrand bisher nur die Unterlage M 9 befallen konnte, während die Kragenfäule bislang nur bei MM 106 diagnostiziert wurde. Der Infektionsweg wäre zum einen so vorstellbar, daß nach starkem Befall der Krone Schleim herabtropft, der dann durch die Borke in die bekanntlich sehr empfindliche Unterlage eindringt, oder daß nach Befall der Krone die Bakterien im Saftstrom weitertransportiert werden, ohne zunächst die typischen Symptome auszubilden. Erst nachdem sie die Unterlage und damit ein günstiges Nährmedium erreichen, können sie sich vermehren und die Symptome ausbilden. Eine Rodung dieser Bäume erscheint insbesondere deshalb unbedingt erforderlich, als der Befall mehrere cm tief unterhalb der Erdoberfläche zu beobachten ist, so daß ein Ausschneiden nicht mehr möglich ist. Erstaunlich bleibt das regional ziemlich eng begrenzte und dennoch starke Auftreten dieses Schadbildes; immerhin wurden bis zu 20 % der Bäume befallen.

M. Seidel

Landespflanzenschutzamt Mecklenburg-Vorpommern, Rostock

Zur Verbreitung und Abwehr des Feuerbrandes in Mecklenburg-Vorpommern

Zusammenfassung

Im Juni 1972 wurde im Küstenbereich des Bezirkes Rostock der erste Befallsherd des Feuerbrandes, verursacht durch *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., für das Gebiet der DDR festgestellt. Anfänglich erfolgten sehr kostenaufwendige, flächendeckende Rodungen aller Befallsherde, um eine Ausbreitung in das Landesinnere hinauszuzögern. So wurden 1972 im Bezirk Rostock 194 Befallsstandorte gelöscht und an 140 Weißdornbefallsherden 150.000 lfd. Meter Hecke entfernt. Besser bewährten sich später Schutzmaßnahmen, um Obstanlagen und Baumschulen vor größeren wirtschaftlichen Verlusten zu schützen, wobei crataegusfreie Zonen um die Anlagen, vorbeugende Behandlungsmaßnahmen, gezielte Bienenwanderung in Obstanlagen u.ä. genutzt wurden. Insgesamt wurden im Küstengebiet Mecklenburg-Vorpommerns, dem Bezirk Rostock, von 1972 bis 1990 863 Befallsherde erfaßt und gelöscht, dabei dominierte mit 567 Standorten und 177.764 lfd. m Rodung der Weißdorn. In Obstanlagen konnte durch die komplexen Abwehrmaßnahmen das Schadausmaß gering gehalten werden.

Zur Verbreitung und zur Kontrolle des Feuerbrandes

Nach dem ersten Auftreten des Feuerbrandes an der Westküste Schleswig-Holsteins im Jahre 1971 waren für das Gebiet der DDR die ersten Befallsnachweise im Küstenbereich des Bezirkes Rostock zu erwarten. Daher führte 1972 der Pflanzenschutzdienst hier gezielt Kontrollen durch. Dabei wurde am 12. 06. 1972 der erste Befallsherd an Weißdorn im Küstenschutzstreifen der Insel Poel bei Wismar festgestellt. Unter Einbeziehung von Suchkräften aus der Land- und Forstwirtschaft sowie weiterer Institutionen konnte das Gebiet des Bezirkes Rostock daraufhin während und nach der Weißdornblüte flächendeckend abgesehen werden, wobei man 1972 fast ausschließlich in den Küstengemeinden Befall beobachtete. Insgesamt wurden 194 Feuerbrand-

herde erfaßt, darunter 140 an Weißdorn. Bei 53 Funden an Obstbäumen, vor allem Birnen, handelte es sich um Einzelbäume in Gärten (Tab. 1).

Die 1972 gesammelten Erfahrungen konnten bei der Kontrolltätigkeit der Folgejahre zugrunde gelegt werden. So wurde in Ergänzung zu den gesetzlichen Festlegungen der 24. Durchführungsbestimmung (anonym, 1972) jährlich für den Bezirk Rostock eine spezifische Konzeption zu Abwehrmaßnahmen gegen den Feuerbrand durch das Pflanzenschutzamt aufgestellt. Diese beinhaltete im wesentlichen, daß ausgehend von den gelöschten Herden des Vorjahres Kontrollen zu Wintersymptomen und ab Blüte Beobachtungen auf Neubefall durchzuführen waren. Der jährliche Erstbefall, der mit einer Ausnahme an Apfel stets an Weißdorn zu beobachten war, wurde dazu festgehalten und diente als Ausgangstermin für intensive Kontrollen. Die früheste Beobachtung des Neubefalls war 1990 am 20.05. zu verzeichnen, der späteste Termin war der 29.06.1982 (Tab.1).

Bei den jährlichen Suchaktionen konzentrierten sich die Mitarbeiter des Pflanzenschutzdienstes insbesondere auf Obstanlagen, Baumschulen, Kleingartenanlagen und öffentliche Grünflächen, während die Pflanzenschutzspezialisten der Betriebe in die Überwachung ihrer Territorien einbezogen waren. In den ersten Jahren wurden die Such- und Abwehrmaßnahmen vorrangig unter dem Aspekt durchgeführt, ein Vordringen der Krankheit in das Landesinnere hinauszuzögern. Nachdem 1980 und 1981 der Feuerbrand praktisch das gesamte Gebiet der DDR erfaßt hatte (Tab. 2), konzentrierten sich die Aktionen auf den Schutz von Obstanlagen und Baumschulen. Dazu wurde im 3 bis 5 km-Radius das Auftreten kontrolliert und Herde beseitigt.

Zu Abwehrmaßnahmen gegen den Feuerbrand

1972 und noch in den Folgejahren konnte man alle festgestellten Befallsherde kurzfristig wieder löschen. Dabei zeigte es sich, daß eine gründliche Beräumung auch der an einen Herd angrenzenden Wirtspflanzen für die Folgejahre den besten Tilgungserfolg zeigte. Da im gesamten Küstengebiet, auf das sich der Befall in den ersten Jahren konzentrierte, Weißdorn in den Windschutzhecken verstärkt vertreten war, erfolgten unter dem Gesichtswinkel der flächendeckenden Beseitigung aller erkannten Be-

fallsherde sehr umfangreiche Rodungsmaßnahmen. Sie beliefen sich im Bezirk Rostock im Jahre 1972 an Weißdorn auf ca. 150.000 lfd. Meter Hecke. Das anfänglich durchgeführte Roden der Herde erwies sich als äußerst arbeits- und kostenaufwendig. Zum Reißen der Stubben benötigte man schwere Technik an Schlepfern bzw. Raupen. Außerdem kam zum Teil eine Erosionsgefährdung in den Küstenschutz zonen hinzu. Daher wurde nach Möglichkeit auf das Absägen in Kombination mit einer herbiziden Stubben nachbehandlung umgestellt.

Durch die umfangreichen Abwehrmaßnahmen offensichtlich mit bedingt, blieb die Krankheit bis 1979 auf das ursprüngliche Befallsgebiet, den Bezirk Rostock, beschränkt. Einzelherde in den Bezirken Potsdam, Magdeburg und Halle im Jahre 1972 und 1973 in den heute zu Mecklenburg-Vorpommern gehörenden Bezirken Schwerin und Neubrandenburg sowie in Frankfurt/Oder, Leipzig und Karl-Marx-Stadt (Chemnitz) wurden sofort wieder gelöscht (Tab. 2).

Im Bezirk Rostock war 1974 erstmals eine verstärkte Infektion an Ziergehölzen, insbesondere in öffentlichen Grünanlagen, so z.B. in Rostock zu verzeichnen. Vorwiegend waren Cotoneaster spp. und Pyracantha betroffen. Daraufhin wurde von Seiten des Pflanzenschutzes beratend Einfluß auf die Planung von Grünanlagen hinsichtlich der Sortimentsauswahl genommen, hochanfällige Wirtspflanzen kamen nicht zum Anbau.

1978 und verstärkt 1979 waren in Rostock erste Befallsherde in Obstanlagen an Quitte und Apfel zu verzeichnen. Dabei war für das Jahr 1979 mit einem erneuten starken Auftreten an Weißdorn typisch, daß nach einem strengen, langen Winter sich Obst-, Ziergehölze und Weißdorn in der Blütezeit überschneiden, so daß über Blüteninfektionen ein Übergreifen der Krankheit auf Obstgehölze möglich war.

Insgesamt wurden im Bezirk Rostock von 1972 bis 1990 an Weißdorn 567 Herde mit einem Umfang von 177.764 lfd. m Hecke und 3.900 Einzelbäumen sowie 3.206 m² Ziergehölze beseitigt. Bei Obstgehölzen dominierte der Befall an Apfel, wobei vorwiegend Rückschnittmaßnahmen genutzt wurden. Im Gebiet der DDR war als stärkstes Befallsjahr nach ersten Befallshöhepunkten in den Jahren 1981 und 1982 das Jahr 1985 mit insgesamt 9.434 Befallsstandorten einzuschätzen (Seidel, Richter, Florin, 1990).

Maßnahmen zum Schutze von Obstanlagen und Baumschulen

Nach den Befallsbeobachtungen der ersten Jahre lagen alle Obstanlagen und Baumschulen des Bezirkes Rostock im befallsgefährdeten Gebiet, so daß besondere Vorbeugemaßnahmen angebracht waren. Von etwa 5.000 ha Obst in geschlossenen Anlagen im Land Mecklenburg-Vorpommern befanden sich ca. 1.600 ha im Bezirk Rostock und von 410 ha Baumschulfläche ca. 180 ha in 4 Baumschulen. Bereits 1972 wurde um alle Obstanlagen mit einer Größe über 5 ha sowie um die Baumschulen eine 500 m breite crataegusfreie Schutzzone durch Rodung des Rot- und Weißdorns geschaffen. Die Betriebe entfernten jährlich den Wiederaustrieb und erweiterten bei einer Vergrößerung der Anlagen auch entsprechend die Schutzzonen. Das Stadtgebiet von Rostock, in dem sich 3 Obstanlagen und 1 Baumschule befindet, wurde 1979 zum feuerbrandgefährdeten Gebiet erklärt. Gemeinsam mit den Betrieben und den für die Grünanlageplanung zuständigen Firmen waren vorbeugende Maßnahmen einzuplanen. So erfolgte im 1 km-Umkreis um die zu schützenden Anlagen keine Bepflanzung von anfälligen Wirtspflanzen in öffentlichen Grünanlagen. Als weitere Schutzmaßnahme für Obstanlagen erfolgten Regelungen zur Bienenwanderung. In Abstimmung mit den Imkern und den Betrieben wurden in allen Obstanlagen, in denen man Befallsherde in den Vorjahren lokalisiert hatte, die Bienenvölker ab Ende der Hauptblüte bzw., wenn Infektionsbedingungen für den Feuerbrand gegeben waren, aus den Anlagen und deren 1 km-Umkreis entfernt. Hierbei konnten mehrjährige Beobachtungen zugrunde gelegt werden, daß vor allem in der Nachblüte witterungsbedingt Infektionsmöglichkeiten häufig gegeben waren. Durch ein Überschneiden des Blühtermin mit anderen Hauptwirtspflanzen des Feuerbrandes, vor allem des Weißdorns, erhöhte sich unter Umständen das Infektionsrisiko. Als Maßnahme des Objektschutzes erfolgten auch weiterhin im 3 bis 5 km-Umkreis von Anlagen eine Beseitigung aller Befallsherde.

In 7 Obstanlagen mit einer Anbaufläche von Apfel und Birnen von 969 ha waren Feuerbrandbefallsherde in mehreren Jahren festzustellen. Zusätzlich zu den o. g. Vorbeugemaßnahmen kamen hier noch Rückschnitte hinzu. Die Erfahrungen zeigten, daß

bei sehr frühem Erkennen der Primärherde ein zügiges, gründliches Entfernen von Befallsästen neben Apfel auch bei Birnen erfolgreich angewendet werden kann. Als Vorbeugemaßnahmen für das Folgejahr kamen in den Befallsquartieren der Einsatz von Bordeauxbrühe als Austriebsspritzung und ein ein- bis zweimaliger Einsatz von bercema-Maneb 80 in die Blüte hinzu.

Literatur

anonym: 24. Durchführungsbestimmung zum Gesetz zum Schutze der Kultur- und Nutzpflanzen - Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.), GB1. DDR Teil II, 1972, Nr. 34, S. 381-383

Seidel, M., Richter, M., Plorin, R.: Schwerpunkte und Tätigkeit der Pflanzenschutzämter auf dem Gebiet der Binnenquarantäne und des Vorratsschutzes, Nachr.-Bl. Pflanzenschutz DDR 44 (1990), S. 128-131

Tab. 1

**Erstauftreten und Befallsherde des Feuerbrandes
im Bezirk Rostock**

Jahr	Erstauf- treten an Weißdorn	Anzahl Befalls- herde (gesamt)	Wirtspflanzen				
			Weißdorn	Birne	Apfel	Quitte	Ziergehölze
1972	12.06.	194	ca. 140	35	17	1	1
1973	20.06.	38	38	-	-	-	-
1974	13.06.	68	35	6	-	1	26
1975	19.06.	18	17	1	-	-	-
1976	16.06.	15	4	2	-	-	9
1977	21.06.	2	2	-	-	-	-
1978	23.06.	26	8	-	7	1	10
1979	06.06.	110	62	17	27	-	4
1980	10.06.	69	34	15	18	-	2
1981	22.05.	142	101	15	11	-	15
1982	29.06.	38	19	8	7	-	4
1983	08.06.	34	22	8	2	-	2
1984	22.05.	22	17	2	1	-	2
1985	10.06.	31	26	2	3	-	-
1986	23.05.	32	23	6	2	-	1
1987	13.06.	8	8	-	-	-	-
1988	07.06.	4	4	-	-	-	-
1989	01.06.	5	4	-	-	-	1
1990	20.05.	7	3	1	2	-	1
zwischen							
1972-	20.05.-						
1990	29.06.	863	567	118	97	3	78

Tab. 2

Entwicklung des Feuerbrandauftretens in der DDR

Bezirke Jahr	Roßtock	Schwerin	Neubrandenburg	Potsdam	Frankfurt	Cottbus	Magdeburg	Halle	Leipzig	Erfurt	Gera	Suhl	Dresden	K.-Marr-Stadt	Berlin
	1972	EN++	—	—	EN.	—	—	EN.	EN.	—	—	—	—	—	—
1973	.	EN.	EN.	.	EN.	—	—	—	EN.	—	—	—	—	EN.	—
1974	x	—	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1975	.	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1976	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1977	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1978	.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1979	xx	—	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1980	x	—	.	xx	—	—	—	—	—	—	—	—	EN.	—	EN.
1981	x	xx	x	xx	x	—	xx	xx	x	—	EN.	—	.	.	.
1982	.	.	.	xx	x	EN.	xx	xx	x	EN.	.	—	x	.	x
1983	.	.	.	x	.	—	x	x	xx	x	.	—	.	.	.
1984	.	.	—	.	.	—	.	x	x	.	—	—	.	.	.
1985	xx	x	x	x	x	x	xx	xx	xx	xx	xx	EN.	x	xx	x
1986	x	x	x	xx	xx	xx	xx	.	xx	x	.
1987	—	.	.	x	.	—	—	.	.	x
1988	—	.	.	x	.	—	—	.	x	—
1989	—	—	—	.	.	.

EN = Erstnachweis

— = kein Nachweis

.

x = starkes Auftreten (etwa 100 Herde mit größerem Rodeumfang)

xx = sehr starkes Auftreten

(bei freien Feldern lagen keine Angaben vor)

J. Dalchow

Hessisches Landesamt für Ernährung, Landwirtschaft und Land-
entwicklung - Pflanzenschutzdienst, Frankfurt am Main

Stand der Verbreitung des Feuerbrandes in Hessen und Maßnahmen
zur Bekämpfung nach der Feuerbrand-Verordnung

Im Jahre 1981 wurde der Erreger des Feuerbrandes zum ersten Mal in Südhessen nachgewiesen. In den folgenden Jahren breitete sich der Befall entlang dem Main-Kinzigtal sowie Odenwald aus; 1986 wurde dann in allen Kreisen Hessens der Feuerbrand festgestellt. Die ersten befallenen Pflanzen waren großblättrige Coto-neaster-Arten, besonders *C. salicifolius floccosus*, danach kamen Weiß- und Rotdorn, Apfel, Birne, Quitte sowie vereinzelt Stran-vaesia und *Sorbus aria* hinzu.

Die Schwere des Befalls und seine Verteilung auf die verschie- denen Wirtspflanzen hängt ausschließlich von den Witterungsbe- dingungen ab. Wenn zur Blütezeit feuchtes Wetter und hohe Tem- peraturen vorherrschen, kommt es zu einem schweren Befall. Auch nach Gewittern war ein starker Befall zu beobachten.

Der Virusmuttergarten, die Reiserschnittgärten und die Wirts- pflanzen-exportierenden Baumschulbetriebe werden mindestens viermal und die anderen Baumschulbetriebe mindestens einmal kontrolliert. Bisher wurde in Baumschulen kein Befall festge- stellt; dagegen 1985 im Reiserschnittgarten Groß-Umstadt, so daß zunächst die Reiserabgabe untersagt und schließlich der Standort als Kernobst Reiserschnittgarten aufgegeben wurde.

Im Erwerbsobstbau wurde bisher nur vereinzelt schwacher Be- fall an Apfel bzw. Birnen verzeichnet, so daß Schnittmaßnahmen zur Bekämpfung ausreichten; nur in einem Fall wurden die Bäume einer hochanfälligen Birnensorte gerodet und verbrannt.

In den Fällen, in denen Feuerbrand im Umkreis von 500 m um Kern- obstanlagen festgestellt wurde, ist gemäß der Feuerbrand-Verord- nung die Vernichtung der befallenen bzw. hochanfälligen Wirts- pflanzen angeordnet und durchgeführt worden. Im Streuobstbau waren keine besonderen Maßnahmen erforderlich. Hier wurden nach einem schweren Befall lediglich Bäume bei der hochanfälligen Birnensorte 'Mollebusch' gefällt.

Karen Falch

Landwirtschaftskammer für das Saarland - Pflanzenschutzamt
Saarbrücken

Situation des Feuerbrandes im Saarland und Maßnahmen zu
seiner Bekämpfung

Seit dem Jahr 1987 ist der Feuerbrand im Saarland nachgewiesen worden. Bei Kontrollen um die Baumschulen im 5 km-Radius wurde erstmals an einem alten Birnbaum in einem Hausgarten die Krankheit festgestellt. Bei anschließenden Kontrollen in diesem Gebiet wurden weitere sieben mit Feuerbrand befallene Sträucher von *Cotoneaster salicifolius floccosus* gefunden.

Der Befall der nächsten Jahre sah wie folgt aus:

1988	7 x <i>Pyrus communis</i>
	1 x <i>Malus sylvestris</i>
	2 x <i>Crataegus monogyna</i>
	23 x <i>Cotoneaster salicifolius</i>
1989	5 x <i>Cotoneaster salicifolius</i>
1990	9 x <i>Cotoneaster salicifolius</i>
	4 x <i>Cotoneaster bullatus</i>
	1 x <i>Cotoneaster x watereri</i> 'Cornubia'
1991	61 x <i>Cotoneaster salicifolius</i>
(bis	3 x <i>Cotoneaster x watereri</i> 'Cornubia'
Mai)	1 x <i>Amelanchier</i>
	1 X <i>Pyracantha coccinea</i>

Die Pflanzen wurden entweder in Hausgärten oder im Öffentlichen Grün angetroffen. Im Öffentlichen Grün lag die Vermutung nahe, daß der Feuerbrand durch Schnittmaßnahmen verbreitet wurde. Für alle Pflanzen wurde eine Rodungsanordnung ausgestellt, z.T. halfen die Gemeinden den Kleingartenbesitzern bei der Rodung bzw. bei der Verbrennung.

Ein Anbauverbot für Feuerbrand-Wirtspflanzen liegt im Saarland nicht vor, es existiert aber eine Empfehlung des Wirtschaftsministeriums aus den 70er Jahren, Feuerbrandwirtspflanzen, insbesondere *Crataegus*, bei Vorhaben der Öffentlichen Hand nicht anzupflanzen. Diese Empfehlung wurde jedoch weitgehend nicht befolgt.

Nachtrag: Das Jahr 1991 war im Saarland ein starkes Feuerbrandjahr. Bis Oktober wurde der Erreger an 130 Pflanzen nachgewiesen. Zum ersten Mal wurde die Krankheit auch in Baumschulen festgestellt. Alle Pflanzen wurden gerodet.

Lutz Gündel

Landespflanzenschutzamt Rheinland-Pfalz, Mainz

Die Feuerbrandkrankheit in Rheinland-Pfalz

Befallssituation

In Rheinland-Pfalz tritt der Feuerbrand an Ziergehölzen seit 1981, an Obstgehölzen seit 1985 auf. Trotz intensiver Rodungsmaßnahmen in den Anfangsjahren hat sich die Pflanzenseuche an Ziergehölzen über weite Landesteile - insbesondere im Rheingraben - ausgedehnt. Obstanlagen waren bislang meist nur punktuell betroffen.

Vorgehen

Vom Pflanzenschutzdienst wird derzeit im wesentlichen nur noch "Objektschutz" betrieben:

- In den bedeutenden Obstbaugebieten werden die Ertragsanlagen stichprobenartig überwacht. Die Obstbauern wurden in Aufklärungsversammlungen und mit Hilfe schriftlicher Informationen intensiv aufgeklärt. Über Telefonanrufbeantworter, Btx und Warndienst wird die aktuelle Befallslage mitgeteilt. Das Vorgehen zielt auf rechtzeitiges Erkennen der Krankheit und schnellen und wiederholten Rückschnitt ab. Rodungen sind derzeit die Ausnahme. Am stärksten betroffen war bislang die Sorte "James Grieve", deutlich weniger "Gloster".
- Alle Baumschulen/Gartencenter werden alljährlich mehrmals kontrolliert und befallene sowie benachbarte Pflanzen sofort eliminiert.
- Eine umfassende Kontrolle aller Hausgärten und des öffentlichen Grüns ist - mit Ausnahme der Umgebung von Obstanlagen, Baumschulen/Gartencentern und des Reiserschnittgartens - nicht möglich. Am häufigsten und stärksten befallen war bislang *Cotoneaster salicifolius floccosus*. An *Crataegus* gab es erst seit ca. 3 Jahren regional stärkeren Befall.

H.G. Michel

Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart

Zur Situation des Auftretens der Feuerbrandkrankheit
(*Erwinia amylovora*) in Baden-Württemberg

In Baden-Württemberg wurde der Erreger der Feuerbrandkrankheit, das Bakterium *Erwinia amylovora*, erstmals 1981 nachgewiesen. Im Zuge der Sanierungen wurden nach diesem Erstauftreten nicht nur Ziergehölzpflanzungen im öffentlichen und privaten Grün, sondern auch einige befallene Birnen- und Apfelbestände gerodet.

Das regional verstärkte Auftreten der Krankheit, vor allem seit 1986, bestätigt die Annahme, daß der Erreger unter den klimatischen Bedingungen von Baden-Württemberg in vielen Jahren ideale Entwicklungsmöglichkeiten vorfindet, wenn man von den höheren und kühleren Lagen absieht. Obwohl ein gleichzeitiges heftiges Auftreten in allen für die Krankheit klimatisch günstigen Gebieten bisher nicht beobachtet wurde, muß immer wieder mit einem lokal begrenzten, schädigenden Befall an Kernobst und anfälligen Ziergehölzen gerechnet werden; in anderen Worten: Eine Ausrottung ist, wie in allen bisherigen Befallsgebieten, nicht mehr möglich.

Stärker befallen wurden neben den Kernobstarten Birne, Apfel und Quitte, vor allem Ziergehölze der Gattung *Cotoneaster* (Zwergmispel) wie *C. bullatus*, *C. salicifolius floccosus*, *C. salicifolius cultivares*, *C. X watereri cultivares*; *Crataegus monogyna* (Weißdorn), *C. laevigata (oxyacantha = Rotdorn)*; *Sorbus aria* (Mehlbeere), gelegentlich auch *Stranvaesia davidiana* (Stranvaesie).

Neben weiteren *Cotoneaster*- und *Sorbus* Arten wurden außerdem *Chaenomeles* (Scheinquitte), *Pyracantha* spp. (Feuerdorn), Zierformen von *Malus* (Apfel) und *Pyrus* (Birne) befallen, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß.

Durchgeführte Abwehrmaßnahmen

Neben den im jeweiligen Einzelfall durchgeführten lokalen Roudungsaktionen der befallenen Wirtspflanzen erfolgten umfangreiche Aufklärungsaktionen über die Krankheit in Form von Merkblättern, Presse, Rundfunk und über Fernsehen. Danach ist jeder Besitzer von Wirtspflanzen des Feuerbrandes aufgefordert durch eigenes Beobachten und entschlossenes Handeln bei Befall einem verstärkten Auftreten dieser Krankheit entgegenzuwirken.

Folgende Empfehlungen wurden herausgegeben:

"Das rechtzeitige Erkennen eines Befalls ist wichtig".

Kernobst und anfällige Ziergehölzbestände müssen während der Vegetationsperiode, besonders ab der Blüte bis Ende August, regelmäßig auf Befall kontrolliert werden.

"Bei Befall ist unverzüglich zu handeln".

Erfahrungsgemäß können schwach befallene Obstgehölze meist durch einen großzügigen Rückschnitt bis mindestens 30 cm in das gesunde Holz gerettet werden. Weiterhin wird bei schwül-warmem Wetter an den erkrankten Pflanzenteilen oft reichlich Bakterien-schleim produziert, der eine gefährliche Infektionsquelle für angrenzende Wirtspflanzenbestände darstellt. Um der Entstehung dieser Infektionsquellen vorzubeugen, ist der Rückschnitt grundsätzlich bereits bei Sichtbarwerden der ersten verdächtigen Symptome durchzuführen, und zwar unabhängig davon, ob ein Befall durch Feuerbrand nachgewiesen wird oder nicht. Wartet man zunächst die Ergebnisse eines Labortests ab, geht in der Regel wertvolle Zeit für eine wirksame Abwehr verloren. Ein schnelles, entschlossenes Handeln ist daher gefordert. Stark befallene Gehölze sind sofort zu roden und zu vernichten.

Dem Schutz besonders gefährdeter Objekte wird eine vorrangige Bedeutung beigemessen ("Objektschutz").

Hierzu gehören:

- Kernobstanlagen des Erwerbssobstanbaues
- Baumschulflächen
- Muttergärten für die Gewinnung virusfreien Vermehrungsmaterials

Zu diesem praktizierten "Objektschutz" gehört insbesondere auch die Überwachung des Umfelds der gefährlichen Objekte. Im Rahmen des Objektschutzes muß die Abwehr und Bekämpfung des Feuerbrandes konsequent nach der Feuerbrandverordnung durchgeführt werden.

Weiterhin wird zum Schutze besonders gefährdeter Objekte empfohlen, weder hochanfällige Wirtspflanzen in deren Nähe anzupflanzen noch zum Verkauf abzustellen.

Der Schutz dieser Objekte ist auch bei Neupflanzungen im Streuobstbau zu berücksichtigen, da hier in der Regel das Kernobst weniger sorgfältig gepflegt und nicht in dem erforderlichen Maß auf Befall kontrolliert wird. Auf Flächen des Streuobstanbaues, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den vorgenannten Objekten liegen, sind daher anstelle von Kernobst bevorzugt Stein- oder Schalenobstsorten zu pflanzen.

Auf Flächen außerhalb der zu schützenden Objekte und der sie umgebenden, im jeweiligen Einzelfall zu definierenden Schutzzonen sind entsprechend der Feuerbrandverordnung alle Maßnahmen auf die Eigeninitiative der Verfügungsberechtigten und Besitzer von Wirtspflanzen abgestellt. Dabei wird immer auf die hohe Verantwortung in bezug eines schnellen Handelns im Interesse der Allgemeinheit hingewiesen.

J.Vogelsanger und R.Grimm

Eidg. Forschungsanstalt, für Obst-, Wein- und Gartenbau,
CH-8820 Wädenswil, Schweiz

Feuerbrandrisiko während der Blütezeit von Wirtspflanzen

In der Schweiz trat der Feuerbrand *Erwinia amylovora* erstmals 1989 auf. Befallspflanzen waren *Cotoneaster dammeri* und *C.salicifolius*. Die drei Krankheitsherde in Stein am Rhein, Eschenz und Stammheim liegen am unteren Ende des Bodensees, in unmittelbarer Nähe eines wenig älteren Befallsherdes im Süd-deutschen Oehningen. Im Befallsgebiet stehen viele verschiedene Wirtspflanzen des Feuerbrandes. Während der Vegetationsperiode werden diese seit einigen Jahren in einem Monitoringverfahren auf Blütenbefall von *E.amylovora* untersucht. Die Ergebnisse werden in Beziehung zum berechneten wetterabhängigen Feuerbrandrisiko gesetzt.

Witterung und Feuerbrandrisiko:

Die Berechnung des Feuerbrandrisikos basiert auf dem Modell nach E.Billing (1980), mit folgenden Spezifikationen nach L.Baumm (1985):

Wenn PD < 0,5 ist, so startet keine IP. Erweiterung der PD-Tabelle: PD= -1 wenn Tmax = 0°C, PD= -2 wenn Tmax -2,5°C.

Die Bewertung des Feuerbrandrisiko erfolgt nach einem Tabellenwert von 0-8 (Abb.1), welcher berücksichtigt, ob eine oder mehrere Infektionsperioden geendet haben, wie lang diese sind, und welche Wetterbedingungen am betreffenden Tag vorherrschen.

Abbildung 1
Wertetabelle für das Feuerbrandrisiko:

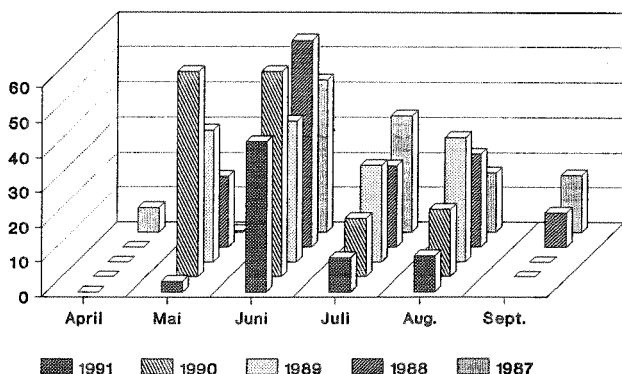
Bedingungen:		Tagesrisiko:		
Endung einer IP der Länge:	> 14 Tg 6-14 Tg 3- 5 Tg	ohne Start einer IP	0,5 1	
		mit Start einer IP	ohne Ns	1,5
			mit Ns	2,5
			ohne Ns	4
			mit Ns	3,5
Endung mehrerer IP der Länge:	> 14 Tg 6-14 Tg 3- 6 Tg	ohne Start einer IP	0,5 1	
		mit Start einer IP	ohne Ns	2
			mit Ns	3
			ohne Ns	5
			mit Ns	4,5
Endung 1 od. mehrerer IP	die bei NS > 25mm gestartet sind:	7	8	

Methode zum Nachweis von Feuerbrand:

Der Nachweis von Feuerbrand erfolgte durch Isolation des Erregers aus verdächtigen Pflanzenproben auf Kings'B und NSA Nährböden. Für die Blütenuntersuchungen wurden 15 Blüten in 8 ml gepuffertem Peptonwasser geschüttelt. Nach 1 Stunde wurde davon auf King's B-Nährboden ausgestrichen. Die Identifikation von *E.amylovora* erfolgte durch Koloniencharakterisierung, durch einen Serumtest und stichprobenweise mit dem Birnentest.

Ergebnisse:

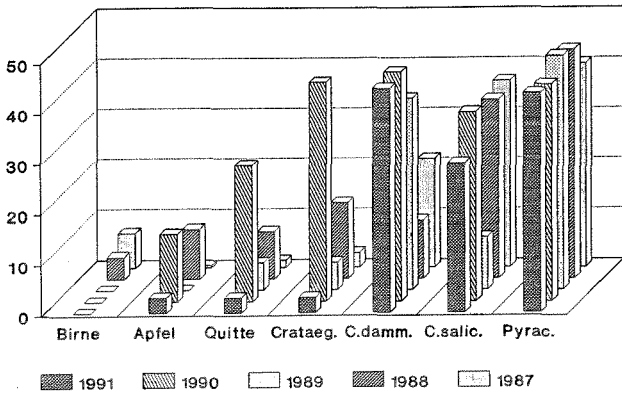
Abbildung 2: Monatssummen vom Feuerbrandrisiko, Schaffhausen, 1987-1991



Das Feuerbrandrisiko in Schaffhausen 1987-1991:

Die Ausbreitung des Feuerbrandes wird durch die meteorologischen Tageswerte massgebend mitbestimmt. Die *Abbildung 2* zeigt die Monatssummen von berechneten Feuerbrandrisiken. Diese weisen grosse Unterschiede in den verschiedenen Jahren auf. Ebenso weisen die Summen der Feuerbrandrisiken während der Blütezeit verschiedener Wirtspflanzen grosse Unterschiede von Jahr zu Jahr auf, was in *Abbildung 3* zum Ausdruck kommt. Im Jahre 1991 war sie für alle vor dem 10. Juni blühenden Wirtspflanzen sehr tief. Aus der gleichen *Abbildung* ist ersichtlich, dass in der Region Schaffhausen das Obst generell niedrigere Risikowerte während seiner Blütezeit aufzuweisen scheint als Ziergehölze wie *C.dammeri*, *C.salicifolius* oder *Pyracantha*.

Abbildung 3: Feuerbrandrisiko während der Blütezeitend, Schaffhausen 1987-1991



Befallene Pflanzenproben:

Insgesamt sind im Jahre 1989 drei Standorte mit befallenen *Cotoneaster dammeri* und drei Funde von *C.salicifolius* entdeckt worden. 1990 waren ein *C.dammeri* und vier *C.salicifolius* befallen. Im Jahr 1991 wurde im August eine Einzelinfektion an einem Birnbaum in Mammern am Bodensee gefunden, im September in Eschenz eine befallene Böschung von *C.dammeri*. Alle befallenen Pflanzen wurden jeweils sofort gerodet.

Besiedlung von Blüten durch *E.amylovora*:

1990 wurde *E.amylovora* mehrmals an Blüten von *Pyracantha* nachgewiesen, ohne dass die Pflanzen krank wurden. Auch an *C.salicifolius* gelang der Erregernachweis Mitte Juni, 2 Wochen später erkrankten die betreffenden Pflanzen. An Blüten von *C.dammeri* konnte der Erreger nicht gefunden werden. 1991 waren ab Anfang Juli vereinzelt Blüten von *C.salicifolius* mit *E.amylovora* besiedelt, diese Pflanzen erkrankten aber nicht.

Diskussion:

Die vorliegenden Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Verbreitung des Feuerbrandes unter den lokalen Verhältnissen besser verstehen zu lernen. Die grosse Bedeutung der Zierwirtspflanzen für die Ausbreitung des Feuerbrandes über die

Blüte ist deutlich zu erkennen. Monitoring-Untersuchungen sind eine wertvolle Hilfe bei der Ueberwachung alter Feuerbrandherde, wenn sie mit einer Feuerbrandprognose koordiniert werden.

Literatur:

- BAUMM, L. 1985. Praxisorientierte Untersuchungen zum Auftreten der Feuerbrandkrankheit im Obstbauggebiet an der Niederelbe. Dissertation.
- BILLING, E. 1980. Fireblight in Kent, England in relation to weather (1955-1976) Ann. appl. Biol. 95, 341-364.
- GRIMM, R. und VOGELSANGER, J. 1989. 1989: Erster Nachweis von Feuerbrand in der Schweiz. Schweiz. Z. für Obst- und Weinbau. 514-516 und 599.
- GRIMM, R. und MANI, E. 1991. Feuerbrand 1990. Schweiz. Z. für Obst- und Weinbau. 61-64.

M. Nachtigall

Biologische Zentralanstalt Berlin
Institut für Phytopathologie Aschersleben

Ein Modell zur Überwachung des Feuerbrandes beim Kernobst

1. Einleitung

Um den Feuerbrand effektiv zu bekämpfen, ist die Bestimmung von optimalen Bekämpfungsterminen anhand wirksamer Verfahren zur Überwachung der aktuellen Befallssituation von größter Bedeutung.

Ogleich es in den letzten Jahren nicht an Versuchen mangelte, derartige Prognosesysteme zu entwickeln, die teilweise zur Interpretation zurückliegender Epidemieverläufe geeignet sind, ist es bisher nicht gelungen, eine durchgängig sichere Methode für eine mehr oder weniger langfristige Vorhersage des Krankheitsauftretens zu entwickeln. Diese Situation macht die intensive weitere Bearbeitung der Feuerbrandepidemiologie unter konkreten mitteleuropäischen Bedingungen zwingend erforderlich.

Im Ergebnis langjähriger Untersuchungen wurde von MÄURER u. FICKE (1989) ein Überwachungssystem erarbeitet, mit dessen Hilfe der Kontrollaufwand reduziert wird und die Durchführung effektiver Bekämpfungsmaßnahmen möglich ist.

2. Material und Methoden

Das System besteht aus drei Hauptkomponenten:

- der Erfassung von spezifischen Anlagengrunddaten zur Ermittlung des Anlagenrisikos auf der Grundlage eines von Beer u.a. (1984) vorgestellten und durch uns modifizierten Bewertungssystems. Nach Addition der Belastungspunkte für alle relevanten anlagenspezifischen Parameter erfolgt die Klassifizierung der Anlagen nach einer dreistufigen Skala;
- der täglichen Wetterdatenerfassung und der Bestimmung des sich daraus ergebenden Wetterrisikos.

Das Resultat der Berechnung ist ein den jeweiligen Gefährdungsgrad widerspiegelndes Gesamtrisiko, das den gezielten Einsatz von Bekämpfungsmaßnahmen, wie z.B. Einsatz von PSM und Befallskontrollen, gestattet und in Zukunft auch eine Empfehlung für den Einsatz eines Bakteriensammlers (EHRIG u. FICKE, 1990) ermöglichen soll.

Zur Berechnung des Wetterrisikos verwendet man in Abhängigkeit von der vorherrschenden Wachstumsphase am besten zwei unterschiedliche Methoden: Während der Blühphase wird das Wetterrisiko auf der Grundlage der täglichen Maximaltemperatur unter Beachtung bestimmter Temperaturschwellenwerte nach BRULEZ u. ZELLER (1981) ermittelt. Im Anschluß an die Blüte, d.h. während der Triebwachstumsphase, hat sich das Verfahren nach BILLING (1980) am besten bewährt, nach dem die Dauer von Inkubationsperioden berechnet und Infektionstage bestimmt werden.

Ausschlaggebend für den Grad der potentiellen Gefährdung ist die Menge der in Folge endenden Inkubationsperioden und deren Länge. Enden Inkubationsperioden an einem Infektionstag, so ist das Befallsrisiko besonders hoch.

Nach FICKE u.a. (1988) erhält das Wetterrisiko bei einmaliger Erfüllung der BILLING'schen Gleichung den Wert 1. Enden 2-3 Inkubationsperioden in Folge, wird dem Wetterrisiko der Wert 2 zugewiesen, während bei mehr als drei beendeten Inkubationsperioden das Wetterrisiko gleich 3 ist.

Durch Multiplikation des jeweiligen Anlagenrisikos mit dem aktuellen Wetterrisiko wird ein anlagenbezogenes Gesamtrisiko berechnet. Während bei einem Gesamtrisiko von 4 Spritzungen und Kontrollen empfehlenswert sind, machen sich bei einem Wert von 6 bzw. 9 Bekämpfungsmaßnahmen unverzüglich erforderlich.

Das System wurde für 6 Meßstellen mit jeweils 100 Anlagen konzipiert und in den entsprechenden Arbeitsversionen in 6 Obstbaubetrieben und 2 wissenschaftlichen Einrichtungen erprobt.

3. Ergebnisse

Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht des Feuerbrandauftretens in einer Apfelanlage des IfP Aschersleben sowie die sich aus dem Gesamtrisiko ergebenden Spritzempfehlungen. Deutlich zu erkennen ist, daß von 9 im Rahmen der Bestandskontrolle registrierten Feuerbrandausbrüche 8 in den Wirkungsbereich der 7 signalisierten Mittelapplikationen gefallen sind. Lediglich der Termin 21.6.88 lag knapp außerhalb einer Empfehlung. Da unseren Untersuchungen zufolge beim Apfel mit einer durchschnittlichen Dauer der Inkubationsperiode von 4-8 Tagen zu rechnen ist, dürfte es aber auch in diesem Fall nicht zu einem Befallsereignis gekommen sein. Aus der in der Abbildung 2 dargestellten Analyse ist zu erkennen, daß zwei Befallsfeststellungen (Mitte bzw. Ende August) nicht mehr in den Zeitraum einer chemischen Behandlung fallen. Insgesamt wurden 5 Spritzungen signalisiert, mit deren Hilfe 4 der insgesamt 6 beobachteten Befallsausbrüche effektiv hätten bekämpft werden können.

Bemerkenswert ist ferner, daß die Bekämpfungsempfehlungen in den letzten drei Jahren erst nach der Blühphase gegeben wurden.

Ein Vergleich der im Rahmen der Feuerbrandüberwachung zu kontrollierenden Apfelanbaufläche auf der Grundlage der bis Oktober 1990 in der ehemaligen DDR geltenden Vorschriften einerseits und der Computersignalisation andererseits ergab am Beispiel der Apfelanbaufläche des Landesgutes Eisleben eine beträchtliche Einsparung sowohl der Kontrollfläche als auch des Kontrollaufwandes.

Im Vergleich zu anderen Prognosemodellen werden mit dem hier vorgestellten Überwachungssystem zwar wesentlich weniger Bekämpfungsmaßnahmen signalisiert, jedoch übersteigt die Anzahl der Empfehlungen noch immer die Zahl der in den Erprobungsbetrieben tatsächlich beobachteten Krankheitsausbrüche.

4. Diskussion

Das hier vorgestellte Überwachungssystem hat sich im praktischen Einsatz durchaus bewährt. Es stellt einerseits eine Arbeitsversion für die Praxis dar und bietet andererseits

die Möglichkeit, darauf aufbauend weitere Untersuchungen durchzuführen.

Die detaillierte Analyse der umfangreichen Erprobungsergebnisse ist gegenwärtig noch nicht beendet.

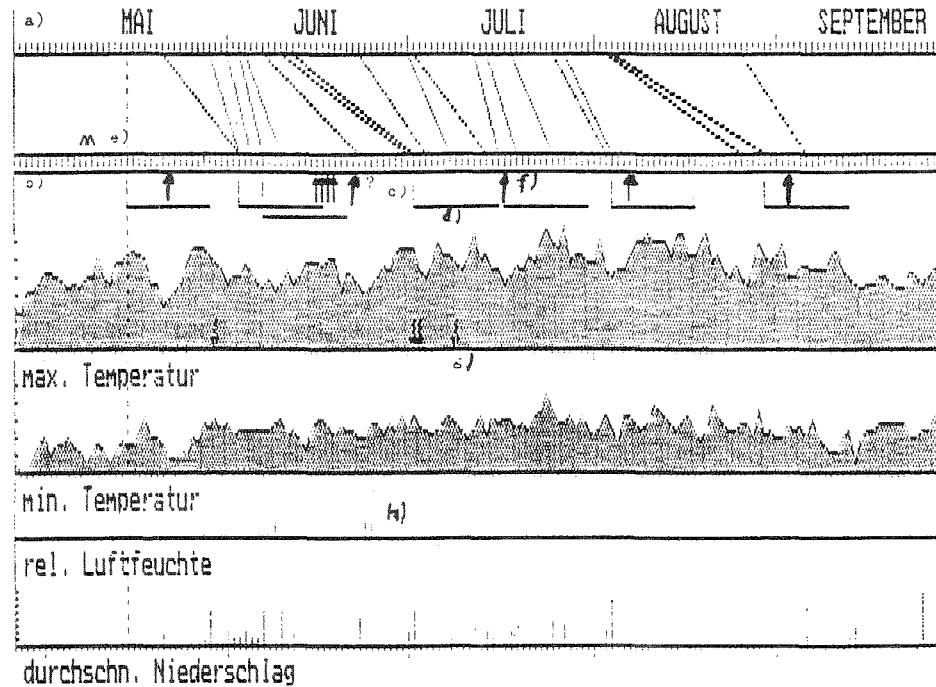
Dennoch liegen neue Erkenntnisse vor, die kontinuierlich in das System zu integrieren sind bzw. als Vorlage für ein neues optimiertes System betrachtet werden können.

Abschließend ist zu bemerken, daß exakte Aussagen über die Treffgenauigkeit und Effektivität der signalisierten Bekämpfungsmaßnahmen nicht möglich sind, da im Untersuchungszeitraum kein großflächiger Befall eingetreten ist.

Literatur

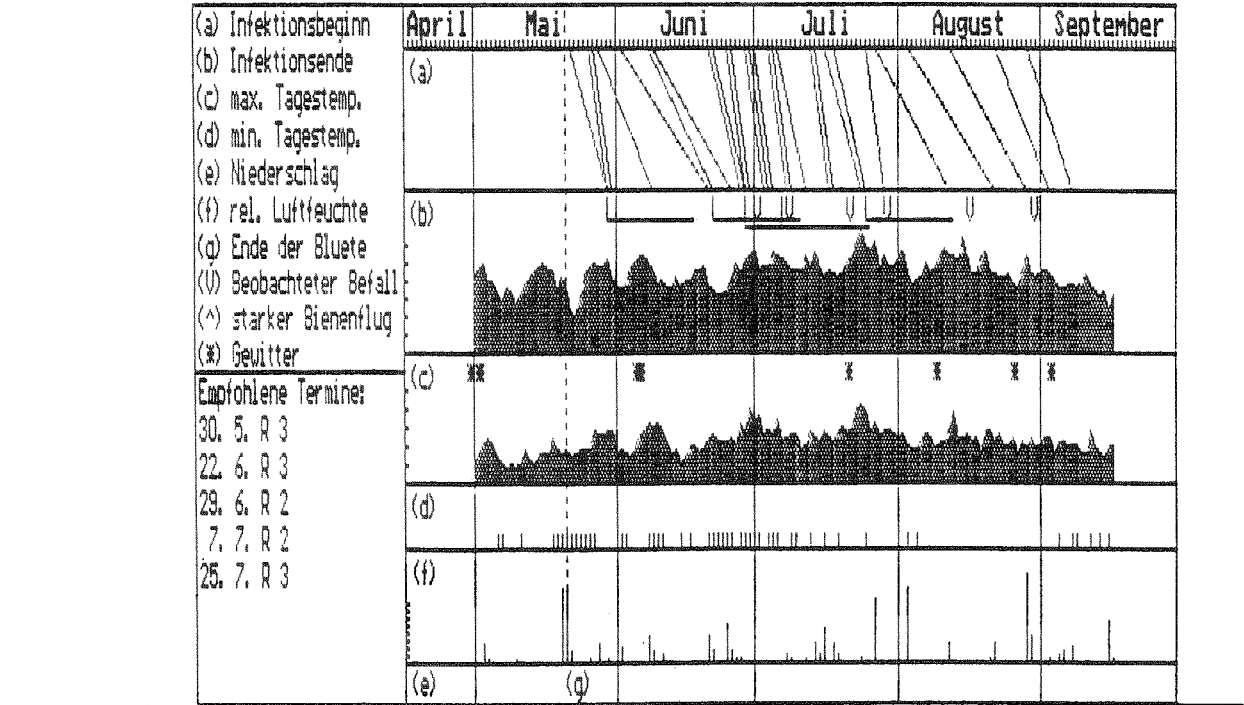
- BEER, S.V.; SCHWAGER, S.J.; NORELLI, J.L.; ALDWINKLE, H.S.;
BURR, T.J.: Towards a practical warning system for fire
blight blossom infection.
Acta Hort. 151 (1984), 23-36
- BILLING, E.: Fire blight (*Erwinia amylovora*) and weather: a
comparison of warning systems.
Ann. appl. Biol. 95 (1980), 365-377
- BRULEZ, W.; ZELLER, W.: Ein neues Prognoseverfahren für Feu-
erbrand (*Erwinia amylovora*).
43. Pflanzenschutztagung in Hamburg, Mitt. BBA 203 (1981),
520,-521
- EHRIG, F.; FICKE, W.: Ein Bakteriensammler zum Nachweis von
Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al. im Freiland.
Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 26 (1990), 99-101
- FICKE, W.; SCHAEFER, H.-J.; RICHTER, K.; NACHTIGALL, M.;
EHRIG, F.: Experimentelle Ermittlung von Inkubationspe-
rioden des Feuerbranderreger, *Erwinia amylovora* (Burrill)
Winslow et al., im Freiland.
Nachr.-Bl. Pfl.-schutz DDR 42 (1988), 163-166
- MÄURER, S.; FICKE, W.: Rechnergestützte Empfehlungen zur Be-
kämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora* (Burrill)
Winslow et al.).
Tag.-Ber. Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin (1989)
278, 95-100

Abb.: 1 Feuerbrandüberwachung und Spritzempfehlungen in der Versuchsanlage Salzkoth 1988



- (a) Kennzeichnung der Infektionstage
- (b) Kennzeichnung des Endes der Inkubationsperiode
- (c) Tage mit empfohlener Spritzung
- (d) Wirkungsdauer der Mittelapplikation
- (e) Tage mit erhöhter Bienenflugaktivität
- (f) Tage mit beobachtetem Feuerbrandbefall
- (g) Tage mit Gewitter
- (h) Tage mit einem Minimum der rel. Luftfeuchte > 70 %

Abb.: 2 **Feuerbrandüberwachung und Spritzempfehlungen in einer Versuchsanlage des Institutes für Obst- und Zierpflanzenbau Skierniewice 1988**



F. Ehrig

Biologische Zentralanstalt Berlin, Institut für
Phytopathologie Aschersleben

Ein Bakteriensammler zum Nachweis von E. amylovora in
Obstanlagen

Alle bisher bekannt gewordenen Feuerbrandprognoseverfahren beruhen auf der Wertung von Witterungsdaten oder auf der Kombination eines Wetterrisikos mit einem Anlagerisiko. Allen Prognoseverfahren ist weiterhin gemein, daß mehr potentielle Befallssituationen signalisiert werden, als tatsächlich Feuerbrandbefall auftritt (FICKE u.a., 1988).

Wie bei jeder anderen Pflanzenkrankheit ist das Auftreten des Feuerbrandes an drei Hauptbedingungen gebunden:

- Die Umweltbedingungen müssen die Entstehung eines stabilen parasitischen Verhältnisses zwischen Erreger und Wirt zulassen. Diese Tatsache ist Schwerpunkt für die Wertung des Wetterrisikos.
- Die Wirtspflanze muß eine ausreichende Infektionsbereitschaft aufweisen. Hierzu werden geeignete Parameter im Anlagenrisiko berücksichtigt.
- Es muß infektiöser Erreger vorhanden sein. Diese Bedingungen werden in den bisher bekannten Prognoseverfahren nur unzureichend erfaßt.

Das Ziel unserer Untersuchungen bestand darin, auf der Grundlage von Prognoseverfahren beruhende Bekämpfungsempfehlungen dahingehend zu optimieren, daß die Durchführung von Bekämpfungsmaßnahmen vom Nachweis des Erregers abhängig gemacht wird (Abb.1).

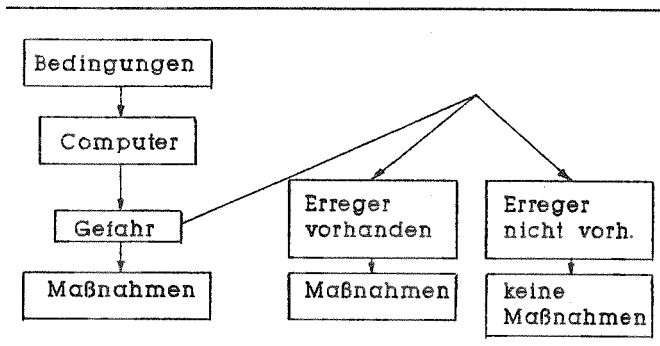


Abbildung 1:

Der sicherste Beweis für das Vorhandensein von *E. amylovora* ist durch eine ständige Sichtbonitur auf Krankheitsbefall zu erreichen. Diesem Verfahren sind aber aus arbeitsorganisatorischen Gründen Grenzen gesetzt. Der Nachweis des Erregers auf Pflanzenteilen durch Kultur in Selektivmedien (MILLER u. SCHROTH, 1972) hat darüberhinaus den Nachteil, daß eine repräsentative Aussage über das Vorkommen des Erregers in der Anlage die Untersuchung einer Vielzahl von Proben erfordert. Wir stellten uns deshalb die Aufgabe, eine Methode zu entwickeln, mit der Erregerzellen in Obstanlagen durch die Untersuchung von Luftproben nachweisbar sind. Hierzu wurden in der Versuchsanlage Salzkoth in Aschersleben mehrjährige Untersuchungen durchgeführt, über die bei FICKE u.a. (1990) ausführlich berichtet wurde.

Durch das Aufstellen agar- bzw. wassergefüllter Petrischalen sowie wassergefüllter Mikrottestplatten konnte gezeigt werden, daß ein Erregernachweis aus der Luft tatsächlich möglich ist. Da dieses Verfahren aber einige schwerwiegende Nachteile aufweist, wurde eine Methode entwickelt, welche die Untersuchung einer größeren, definierten Luftmenge auf Erregerzellen gestattet und zur Entwicklung des Bakteriensammlers führte (EHRIG u. FICKE, 1990). Mit diesem Gerät wird Luft angesaugt und in eine Flüssigkeit (100 ml) geblasen. In der Luft vorhandene Erregerzellen werden in der Flüssigkeit ("Fangflüssigkeit") suspendiert. Als Ergebnis einer mehrjährigen Erprobung zweier stationär betriebener Bakteriensammler konnte deren Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden. Der stationäre Betrieb von Bakteriensammlern an verschiedenen Stellen in Obstanlagen erfordert jedoch einen zu hohen Aufwand. Mit der erfolgreichen Erprobung der stationären Geräte waren die Voraussetzungen gegeben, einen mobilen, vielseitig und variabel einsetzbaren Bakteriensammler zu entwickeln. Die mobile Variante des Bakteriensammlers ist ein kompaktes Gerät, daß mit einer speziellen Haltevorrichtung an jedem Traktor befestigt werden kann. Die Spannungsversorgung erfolgt über das Bordnetz des Traktors. Der Luftdurchsatz beträgt ca. 1000 Liter pro Stunde. Der Betrieb des Bakteriensammlers beeinträchtigt die Einsatzmöglichkeiten des Traktors nicht, so daß der Bakteriensammler

auch während routinemäßiger Pflanzenschutz- und Pflegemaßnahmen einsetzbar ist.

Zur Entwicklung eines geeigneten Nachweisverfahrens für die Erregerzellen wurde ein Methodenvergleich unter Einbeziehung der Agarkultur, der Immunfluoreszenztechnik (IFT), des ELISA sowie des Dot-immunobinding-assay (DIBA) durchgeführt. Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß mit allen geprüften Methoden der Erregernachweis geführt werden kann (FICKE u.a., 1990). Allerdings weisen sowohl die Agarkultur, als auch die IFT und der ELISA bei der Untersuchung der Fangflüssigkeit wesentliche Nachteile auf (Abb. 2).

Möglichkeiten des Erregernachweises

- Auslegen der Proben auf Agar
 - Nachteile : - Zeitdauer
 - Verunreinigungen
 - geringe Probenmenge
- Immunfluoreszenztechnik
 - Nachteile : - gerätetechnischer Aufwand
 - umfangreiche praktische Erfahrungen notwendig
 - geringe Probenmenge
- ELISA
 - Nachteile : - Zeitdauer
 - geringe Probenmenge
- Dot-immunobinding-assay (DIBA)

Abbildung 2:

Als Methode der Wahl erwies sich deshalb der DIBA (TOWBIN u. GORDON, 1984).

Der DIBA stellt eine spezifische Variante des ELISA dar. Hierbei werden die Antigene auf Nitrozellulosefilter aufgebracht und dort auf Grund spezifischer Materialeigenschaften fixiert. Nach der Behandlung der Filter in einer Konjugatlösung erfolgt eine enzymatische Farbreaktion. Ein wesent-

licher Vorteil dieser Methode besteht darin, daß man eine relativ große Menge der Fangflüssigkeit auf dem Nitrozellulosefilter anreichern kann. Während die Probenmenge beim Standard-ELISA 200 µl beträgt, kann man beim DIBA ca. 50 ml durch Filtration auf eine Filterfläche von 75 mm² aufbringen. Nach unseren Erfahrungen liegt die Nachweisgrenze beim DIBA um 1-2 Zehnerpotenzen unter der des ELISA. Während mit dem ELISA 10⁴ bis 10⁵ Zellen pro ml nachgewiesen werden können, kann durch den DIBA dank zusätzlicher Anreicherung und der niedrigeren Nachweisgrenze noch eine Erregerkonzentration von 20 Zellen pro ml Fangflüssigkeit erfaßt werden.

Weitere Vorteile des DIBA bestehen darin, daß die gerätetechnischen Voraussetzungen für seine Durchführung gering sind, und daß die Dauer der Nachweisreaktion im Vergleich zum ELISA (ca. 40 Std.) nur 2-4 Std. beträgt. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz des Bakteriensammlers in Praxisbetrieben ergibt sich hieraus die Möglichkeit, beim Auftreten des Erregers kurzfristig reagieren zu können.

Wie bei allen serologischen Nachweisverfahren ist das Reaktionsergebnis des DIBA von einer Reihe Faktoren abhängig. Dazu gehören z.B. die Reaktionstemperatur, die Inkubationsdauer, die Lichteinwirkung, die Qualität der verwendeten Chemikalien, die Qualität des Konjugates, die Eigenschaften der Nitrozellulosefilter und andere. Da diese Faktoren unter Praxisbedingungen schwer zu standardisieren sind und um eine Aussage über die in der Fangflüssigkeit vorhandene Erregermenge treffen zu können, wurde eine quantitative Variante des DIBA entwickelt. Diese beruht darauf, daß auf die Nitrozellulosefilter neben die Sammlerprobe Referenzproben definierter Bakterienkonzentrationen aufgebracht werden. Da Sammler- und Referenzproben unter identischen Bedingungen behandelt werden, kann durch einen direkten Vergleich der Farbintensität der Sammler- und Referenzproben auf die Erregerkonzentration in der Fangflüssigkeit geschlossen werden. Über Einzelheiten der quantitativen DIBA-Variante wird an anderer Stelle berichtet.

Eine Aussage über eine mögliche Korrelation zwischen Erregernachweis und dem Befallsverlauf ist erst nach Auswertung des bisher gesammelten umfangreichen Datenmaterials möglich. Grundsätzlich kann jedoch eingeschätzt werden, daß mit dem System Bakteriensammler - DIBA auch geringe Erregermengen in der Luft nachgewiesen werden können. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit des Verfahrens ist ein Einsatz unter Praxisbedingungen möglich.

Literatur:

- EHRIG, F.; FICKE, W.: Ein Bakteriensammler zum Nachweis von *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. im Freiland. Arch. Phytopath. Pflanzenschutz 26 (1990), 99-101
- FICKE, W.; EHRIG, F.; NACHTIGALL, M.; NAUMANN, K.; RICHTER, K.; ZIELKE, R.: Möglichkeiten der Erfassung in der Luft befindlicher Zellen des Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.). Zentralbl. Mikrobiol. 145 (1990), 121-133
- FICKE, W.; PETER, E.; HEYTER, F.; NACHTIGALL, M.; SCHAEFER, H.-J.; RICHTER, K.; EHRIG, F.: Vergleich von prognostizierten mit experimentell ermittelten Inkubationsperioden von *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.. Arch. Phytopath. Pflanzenschutz 24 (1988), 99-101
- MILLER, T.D.; SCHROTH, M.N.: Monitoring the epiphytic populations of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology 62 (1972), 1175-1182
- TOWBIN, H.; GORDON, J.: Immunoblotting and immunobinding: current status and outlook. J. Immunol. Methods 72 (1984), 131-134

W. Zeller

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, 6915 Dossenheim

Erfahrungen mit neueren bakteriziden Verbindungen gegen den
Feuerbrand (Erwinia amylovora)

Nachdem in den letzten Jahren in einigen EG-Ländern neben dem Antibiotikum Streptomycin weitere bakterizide Verbindungen gegen den Feuerbrand zugelassen worden sind, in Frankreich, Belgien, Niederlande z.B. das Firestop oder MBR-Fructil (BRISSET et al. 1990, DECKERS et al. 1990), wurden von uns diese und andere neuere bakterizide Verbindungen unter Freilandbedingungen gegen Erwinia amylovora geprüft, um uns ein Bild von deren Effektivität machen zu können. Die insgesamt getesteten Versuchspräparate sind nachfolgend in Tab. 1 wiedergegeben.

Methodik

Als Wirtspflanzen wurden zwischen 2-5jährige Sträucher der hochanfälligen Cotoneaster-Sorte Cotoneaster salicifolius floccosus verwendet. Die Versuche erfolgten in randomisierten Blöcken von 5-8 Versuchspflanzen über 2 Versuchsjahre (1989 und 1990) auf der Feuerbrandversuchsanlage der BBA in Kirschgartshausen.

Tab. 1 Gegen den Feuerbrand getestete Verbindungen

Produkt	Wirkstoff	%	Firma/Labor
Kupferoxychlorid		35	Ciba Geigy
Streptomycin	Streptomycinsulfat	17	Hoechst AG
Nourseothricin			Aschersleben*
S-0208	Analog d.Oxanilinsäure	20	Sumitomo/Japan
Firestop	Flumequine	80	3M-Company
Aliette	Fosetyl-Aluminium	74.6	Agrotec

* Institut f. Phytopathologie der BZA

Zusätzlich zu den bakteriziden Präparaten wurde das Fungizid Aliette getestet, das in Untersuchungen von französischen Autoren eine positive Wirkung gezeigt hatte (PAULIN et al. 1990). Die Pflanzen wurden künstlich infiziert, indem eine Suspension eines hochpathogenen Stammes von *E. amylovora* in einer Konzentration von ca. 10^8 Zellen/ml in die Vollblüte gesprüht wurde. Die einzelnen Verbindungen wurden jeweils protektiv eingesetzt, meist 3 Std. vor der künstlichen Infektion. Eine weitere Spritzung erfolgte 3-4 Tage nach der Inokulation. Bei der Variante Aliette wurde zusätzlich eine Behandlung 4 Tage vor der Infektion eingebaut, um eine eventuell von dem Mittel ausgehende Resistenz-induzierende Wirkung, wie sie z.B. gegenüber Pilzen bekannt ist, zusätzlich zu erfassen. Als Vergleichsstandard wurde jeweils das Antibiotikum Streptomycin eingesetzt.

Tab. 2: Feuerbrand-Bekämpfung an *Cotoneaster salicifolius floccosus* nach Blüteninfektion, Kirschgartshausen 1989

Behandlung	Konz. %	Blütenstände		Befall %	Wirk. grad %
		behand.	infiz.		
Streptomycin	0.01	897	42	4.7	94.4
Kupferoxychlorid	0.1	972	97	10.0	87.0
S-0208	0.03	857	135	15.8	79.2
Aliette	0.4	827	454	54.9	27.8
Aliette Induktion	0.4	671	273	40.8	46.2
Kontrolle infiz.	-	1080	819	75.9	-
Kontrolle H ₂ O	-	1229	34	2.8	-

Künstliche Inokulation: 31.5.1989

Bonitur: 3.7.1989

Tab. 3: Feuerbrand-Bekämpfung an *Cotoneaster salicifolius floccosus* nach Blüteninfektion, Kirschgartshausen 1990

Behandlung	Konz. %	Blütenstände		Befall %	Wirk. grad %
		behand.	infiz.		
Streptomycin	0.01	878	31	3.5	92.8
S-0208	0.03	829	36	4.3	91.1
Nourseothricin	0.3	753	19	2.5	94.8
Nourseothricin	0.5	843	17	2.0	95.8
Firestop	0.03	864	62	7.1	85.3
Aliette	0.4	702	197	28.1	42.1
Kontrolle infiz.	-	753	365	48.5	-
Kontrolle H ₂ O	-	632	12	1.9	-

Künstliche Inokulation: 25.5.1990

Bonitur: 10.7.1990

Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Versuchsjahr 1989 herrschten sehr gute Infektionsbedingungen vor, so daß der prozentuale Blütenbefall bei *Cotoneaster salicifolius floccosus* bei 75,9 % lag. Das als Standard eingesetzte Streptomycin ergab mit > 90 % Wirkungsgrad den besten Effekt. Außerdem zeigte das Kupferoxychlorid mit seiner allgemein bekannten protektiven Wirkung einen sehr guten Bekämpfungserfolg von mehr als 85 %. Auch das Oxanilinsäure-Analog S-0208 erbrachte, wie schon aus anderen Versuchen hervorging, eine gute Wirkung von nahezu 80 %. Das von den französischen Autoren als effektiv gefundene Fungizid Aliette (PAULIN et al. 1990) wies eine unbefriedigende Wirkung auf (27.8 %), zeigte jedoch eine Tendenz zu einer Resistenzinduktion, d.h. eine deutliche Zunahme auf 46 % Bekämpfung bei einem Einsatz 4 Tage vor der künstlichen Inokulation. Dennoch kann dieser Wirkungsgrad nicht als ausreichend betrachtet werden.

Im zweiten Versuchsjahr 1990 wurde zusätzlich das Antibiotikum Nourseothricin, das zuvor bereits in der ehemaligen DDR gute Erfolge erzielt hatte, neben dem bereits in einigen westeuropäischen Ländern zugelassenen Firestop getestet. Insgesamt lag der Blütenbefall in diesem Jahr deutlich niedriger bei 48.5 %.

Mit Ausnahme von Aliette zeigten alle eingesetzten Präparate einen sehr hohen Wirkungsgrad (Tab. 3). Noch besser als das Streptomycin schnitt das Antibiotikum Nourseothricin in beiden eingesetzten Konzentrationen von 0.3 und 0.5 % ab; es lag in beiden Fällen bei 95 % Wirkungsgrad. Auch die Flumequine-Verbindung Firestop sowie das wiederum getestete Versuchspräparat S-0208 zeigten eine ähnlich positive Wirkung von 85.3 bzw. 91.1 %. Letztere Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit anderen Autoren, die unter künstlichen und natürlichen Infektionsbedingungen an Birne und Apfel durchgeführt wurden (DECKERS et al. 1990, JONES and BYRDE 1987, BRISSET et al. 1990, DIMOVA-AZIZ, 1990). Auf Grund der insgesamt sehr guten Wirkungen dieser neuen bakteriziden Verbindungen sollte daher eine Zulassung für eines dieser effektiven Mittel in die näheren Überlegungen einbezogen werden, zumal sich in letzter Zeit der Feuerbrand in bedrohlichem Maße vor allem in den süddeutschen Obstanbaugebieten der Pfalz und Baden-Württembergs ausgebreitet hat.

Literatur

- BRISSET, M.-N. CHEVALIER, R., CHARTIER, R. and PAULIN, J.-P., 1990: Experimentations with Firestop 3M in the chemical control of fireblight. Acta Hort. 273, 413-418
- DECKERS, T., PORREYE, W. and MAERTENS, PH., 1990: Three years of experience in chemical control of fireblight in pear orchards in Belgium. Acta Hort. 273, 367-376
- DIMOVA-AZIZ, M., 1990: Chemical control of fire blight blossom infection under field conditions in Cyprus. Acta Hort. 273, 377-382
- JONES, D.R. and BYRDE, R.J.W., 1987: Chemical control of fireblight on cider apple. Acta Hort. 217, 235-238
- PAULIN, J.P.P., CHARTIER, R., LARUE, P., LECOMTE, P., BRISSET, M.N. and LACHAUD, G. 1990: Experiments with Aliette Phosetyl-Aluminium in fireblight control. Acta Hort. 273, 383-389

MOSCH, Janina und ZELLER, W.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt und
Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim.

Zur Wirkung von Pflanzenextrakten gegen den Feuerbrand (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.)

Seit etwa vier Jahren werden an den obigen Instituten der Biologischen Bundesanstalt Untersuchungen zur Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora* durchgeführt (MOSCH UND KLINGAUF 1989, MOSCH UND ZELLER 1989) als eine mögliche biologische Alternative zum chemischen Pflanzenschutz.

Bei der Überprüfung von mehr als 100 einheimischen Pflanzenarten auf ihre Wirkung in vitro zeigten 24 pflanzliche Auszüge im Agar-Diffusionstest einen deutlichen Hemmeffekt gegen das Pathogen (MOSCH, KLINGAUF UND ZELLER 1990).

Am wirksamsten waren Blattextrakte aus Essigbaum (*Rhus typhina* L.), Schwarznuß (*Juglans nigra* L.) sowie Berberitze (*Berberis vulgaris* L.), deren Wirkung der von Streptomycin vergleichbar war. Nach den erfolgreichen in-vitro Ergebnissen wurden nachfolgend drei Extrakte ausgewählt, um sie auch unter Freilandbedingungen auf ihren Effekt gegen die Bakteriose zu überprüfen.

Material und Methoden

Als Wirtspflanzen wurden sowohl hochanfällige Ziersträucher, wie *Cotoneaster salicifolius* var. *floccosus* (1988 und 1989), als auch anfällige Apfel- und Birnen-Sorten (James Grieve und Conference) (1990) verwendet.

Getestet wurden Extrakte aus folgenden drei Pflanzenarten: *Berberis vulgaris* L., *Mahonia aquifolium* Nutt und *Rhus typhina* L. Ihre Herstellung erfolgte aus Frischblattmaterial. Dazu wurden in einer Extraktionsapparatur (Soxhlett) Blätter mit Ethanol (je 100 g Pflanzenmaterial + 750 ml 96% Alkohol) über

vier Stunden extrahiert und anschließend auf 1/10 ihres Volumens eingeeengt. Diese Extrakte dienten als Ausgangsmaterial für die Versuche und wurden unmittelbar vor den Spritzbehandlungen mit Leitungswasser verdünnt und in den in den Tab. 1 und 2 angegebenen Konzentrationen ausgebracht. Zum Vergleich wurden die bakteriziden Verbindungen Streptomycin und Kupferoxychlorid eingesetzt.

Die Versuchsanordnung bestand aus fünf Wiederholungen zu je einem Strauch bzw. Baum mit 5-6 markierten Ästen in voll randomisierten Blöcken. Alle Versuchspflanzen wurden während der Vollblüte zweimal mit den Pflanzenextrakten behandelt. Die Ausbringung erfolgte mit einer Rückenspritze bis zur Tropfnässe. Nachdem die Blüten zuvor abgetrocknet waren, wurde die künstliche Infektion mit dem Erreger drei Stunden nach der ersten Spritzbehandlung mit einer Bakteriensuspension von ca. 10^8 Zellen/ml durchgeführt. Als Bakterienstamm wurde ein hochpathogenes Isolat von *Cotoneaster bullatus* verwendet. Als Kontrolle dienten künstlich infizierte Pflanzen sowie nur mit Wasser behandelte Sträucher.

Der Wirkungsgrad der einzelnen Varianten wurde nach der Formel von ABBOTT (1925) berechnet.

Ergebnisse

In den Freilandversuchen mit der hochanfälligen *Cotoneaster* - Art zeigten alle getesteten Präparate in beiden Versuchsjahren einen hemmenden Effekt auf den Feuerbranderreger.

Im ersten Versuchsjahr wiesen die Extrakte zwar eine schwächere Wirkung als das Kupferpräparat und Streptomycin auf, dennoch konnte ihre Wirkung im Vergleich zur Kontrolle statistisch abgesichert werden (Tab.1). Im folgenden Jahr wurde die ursprünglich eingesetzte Konzentration des Berberitze- (5%) und des Essigbaumextrakts (2,5%) verdoppelt. In dieser erhöhten Konzentration zeigten alle pflanzlichen Präparate wiederum sehr positive Bekämpfungseffekte gegen den Feuerbrand. Der Wirkungsgrad des Essigbaumextrakts stieg auf 75,2% und lag nur wenig unter dem zum Vergleich eingesetzten Kupferoxychlorid (85,8%). Der Wirkungsgrad der Auszüge von Berberitze und

Mahonie war ebenfalls relativ hoch und betrug 62% bzw. 54% (Tab.1).

Im Jahr 1990 wurden die Freilandversuche mit den drei Pflanzenextrakten an Obstbäumen fortgeführt. Leider waren in diesem Jahr die Witterungsbedingungen für die spätere Symptomentwicklung, insbesondere bei den Birnenbäumen, sehr ungünstig (kalt und trocken). Trotz dieser negativen Wettereinflüsse, die zu einer verzögerten Ausbildung von Krankheitssymptomen führte, wurde durch den Einsatz des Auszugs von Mahonia ein Wirkungsgrad von fast 43% festgestellt (Tab.2). Die erhöhte Konzentration des Berberitze- (16%) und Essigbaumextrakts (8%) erwies sich dagegen für die Birnenblüten als phytotoxisch, was vermutlich gemeinsam mit der Kälte die spätere starke Krankheitsentwicklung zur Folge hatte. Die Blütenstände der behandelten Birnenbäume wurden bis zu 93,3% befallen (Berberitzeextrakt) und übertrafen damit den Bafall der Kontrolle (90%).

Im Versuch mit den Apfelbäumen der Sorte James Grieve wurden ähnliche Extraktkonzentrationen wie in den Versuchen mit *Cotoneaster salicifolius*, d.h. Berberitze- 8%, Mahonie- 10%, und Essigbaumextrakt 4%, angewandt.

In diesem Versuch erwies sich der Auszug von Berberitze als sehr hochwirksam und erreichte den Wirkungsgrad von Streptomycin (72,3%). Die Mahonievariante zeigte dagegen mit nur 27,3% die geringste Wirkung.

Diskussion

Die bioziden Eigenschaften von Pflanzeninhaltsstoffen sind seit langem bekannt und wurden durch zahlreiche Publikationen belegt. Diese Eigenschaften werden bislang vor allem in der Humanmedizin, aber kaum in der landwirtschaft- und gartenbaulichen Praxis genutzt. Erst in letzter Zeit ist das Interesse an pflanzlichen Wirkstoffen im Pflanzenschutz größer geworden (KLINGAUF UND HERGER 1985, KLINGAUF ET AL. 1988, HIRSCHFELD UND KLINGAUF 1988, HERGER 1991,).

Nach den in-vitro nachgewiesenen positiven Effekten einer großen Anzahl von Pflanzenextrakten gegen den Feuerbranderreger

(MOSCH UND KLINGAUF 1989) konnte auch in den Freilandversuchen mit drei ausgewählten Blattauszügen von Berberitze, Mahonie und Essigbaum eine hemmende Wirkung auf das Bakterium nach künstlicher Blüteninfektion an der Wirtspflanze *Cotoneaster salicifolius* var. *floccococcus* festgestellt werden. Dabei konnten Wirkungsgrade bis zu 75,2% bei der Essigbaumvariante im Vergleich zu 85,8% Kupferoxychlorid erreicht werden (Tab.1).

Die Ergebnisse des einjährigen Versuches an Obstbäumen waren dagegen nicht befriedigend. Eine entscheidende Rolle spielte hier neben den Wetterbedingungen die eingesetzte Extraktkonzentration. Eine zu hohe Konzentration des Extraktes kann sich phytotoxisch auf Blüte und Blatt auswirken, dagegen hemmt eine zu niedrige die Krankheitsentwicklung nicht in ausreichendem Maße. In weiteren Versuchen soll daher der Optimierung der Konzentrationen aller drei eingesetzten Extrakte noch näher nachgegangen werden.

Die im Vergleich dazu verwendeten chemischen Bekämpfungsmittel, das Kupferoxychlorid und das Antibiotikum Streptomycin, wiesen insgesamt einen höheren Wirkungsgrad auf. Das dürfte vor allem auf die bekannte protektive Wirkung dieser Präparate zurückzuführen sein (ZELLER 1980), zumal die künstliche Infektion mit dem Erreger in den Versuchen bereits kurze Zeit nach der ersten Spritzbehandlung erfolgte.

Zusammenfassend läßt sich nach diesen dreijährigen Versuchen feststellen, daß die drei getesteten Pflanzenextrakte aus *Rhus typhina*, *Berberis vulgaris* und *Mahonia aquifolium* über eine bemerkenswerte bakterizide Wirkung gegen den Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora* verfügen. Weitere Bekämpfungsversuche vor allem an Kernobst müssen zeigen, ob die Pflanzenauszüge als ein wirksames biologisches Bekämpfungsverfahren zukünftig gegen diese den Obstbau gefährdende Krankheit eingesetzt werden können.

Literatur

ABBOTT, W. S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. - J. Econ. Entomol. 18, 265-267

HERGER, G. (1991): Die Wirkung von Auszügen aus dem Sachalin-Staudenknöterich *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltaupilze. - Diss. Darmstadt, 127 Seiten.

HIRSCHFELD, A. und F. KLINGAUF (1988): Repellency of extracts against the cabbage root fly, *Delia radicum*. - Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 53 (3a), 997-1005.

KLINGAUF, F. und G. HERGER (1985): Die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Echten Mehltau an Wintergerste, *Erysiphe graminis* f.s. *hordei*. - Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 50 (2b), 531-538.

KLINGAUF, F., U. STEIN, H.-J. BESTMANN, O. VOSTROWSKY, B. CLASSEN und U. KOBOLD (1988): Pflanzliche Insektizide VI. Wirkung eines ethanolischen Blattextraktes aus Essigbaum (*Rhus typhina*) auf verschiedene Schadinsekten. - J. appl. Entomol. 105., 41-47.

MOSCH, J. und F. Klingauf (1989): In-vitro-Untersuchungen über die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Erreger des Feuerbrandes, *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al. - Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 41, 121-123.

MOSCH, J. und W. ZELLER (1989): Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*) mit ausgewählten Pflanzenextrakten. - Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 41, 149-151.

MOSCH, J., KLINGAUF, F. und W. ZELLER (1990): On the Effect of Plant Extracts against Fireblight (*Erwinia amylovora*). - Acta Hort. 273, 355-361.

Zeller, W. (1980): Untersuchungen zur chemischen Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*). - Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. 87, 32-36.

Tab.1. Blütenbehandlung an *Cotoneaster salicifolis floccosus* nach künstlicher Inokulation mit *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. in Jahren 1988 und 1989

Behandlung	1988				1989			
	Konzentration(%)	Anzahl der behandelt	Blütenstände infiziert(%)	Wirkungs- grad(%)	Konzentration(%)	Anzahl der behandelt	Blütenstände infiziert(%)	Wirkungs- grad(%)
Kupferoxychlorid	0,1	598	7,2	80,2	0,1	1006	9,7	85,8
Streptomycin	0,01	574	10,8	70,2	0,01	781	4,0	94,1
Berberitzeextrakt	5,0	559	17,9	50,7	10,0	1151	25,9	62,0
Mahonieextrakt	10,0	506	17,0	53,2	10,0	1136	31,4	54,0
Essigbaumextrakt	2,5	868	26,3	27,5	5,0	1009	16,9	75,2
Kontrolle infiz.	-	534	36,3	-	-	1114	68,3	-
Kontrolle H ₂ O	-	562	0,3	-	-	1220	1,7	-

- 53 -

Tab.2. Blütenbehandlung an Obstbäumen nach künstlicher Inokulation mit *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. im Jahr 1990. Anzahl der Blütenstände = 30

Behandlung	Birnen				Äpfel			
	Konzentration(%)	Blütenstände infiz.(%)	Befall(%)	Wirkungs- grad(%)	Konzentration(%)	Blütenstände infiz.(%)	Befall(%)	Wirkungs- grad(%)
Streptomycin	0,01	2	6,7	90,5	0,01	3	10,0	72,7
Berberitzeextr.	16,0	28	93,3	0	8,0	3	10,0	72,7
Mahonieextr.	10,0	12	40,0	42,9	10,0	8	26,7	27,3
Essigbaumextr.	8,0	27	90,0	0	4,0	7	23,3	36,4
Kontrolle infiz.		21				11		
Kontrolle H ₂ O		1				1		

K. Naumann und Renate Gierz

Biologische Zentralanstalt Berlin
Institut für Phytopathologie Aschersleben

Chancen und Grenzen einer Biologischen Bekämpfung des Feuerbrandes mit Hilfe bakterieller Antagonisten

Einleitung

Verfahren zur Biologischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten gewinnen gegenwärtig immer mehr an Bedeutung. Auf die Ursachen für diese Entwicklung kann hier leider nicht eingegangen werden. Als wirksame Faktoren spielen dabei Bakterien als Antagonisten eine besondere Rolle. Auf der anderen Seite stellen pflanzenpathogene Bakterien in einigen Fällen auch die Zielobjekte von biologischen Bekämpfungsmaßnahmen dar. Herausragende Beispiele hierfür sind *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn und *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Schon 1941 haben ARK & HUNT erstmalig *Bacillus*-Isolate beschrieben, die den Feuerbranderreger *in vitro* hemmten. Mehrfach wurden *E. herbicola*-Stämme isoliert, die auf *E. amylovora* antagonistisch wirkten bzw. den Feuerbrandbefall senkten (ältere Literatur s. bei ZELLER 1974). Besonders eingehend haben sich in letzter Zeit ISENBECK (1983) sowie ISENBECK und SCHULZ (1985) mit dieser Problematik befaßt. Es konnte auch gezeigt werden, daß *E. herbicola* einen Antibiotikum-ähnlichen Stoff produziert, der aber offensichtlich nicht allein für deren antagonistische Wirkung verantwortlich ist (WODZINSKI et al. (1987), VANNESTE et al. (1990), EL-GOORANI and BEER (1991). Die Mechanismen der Hemmwirkung auf *E. amylovora* sind noch weitgehend unbekannt. Es werden neben direkten Effekten durch antibakterielle Substanzen auch indirekte Wirkungen diskutiert, etwa die Blockierung spezifischer für den Erreger essentieller Rezeptoren auf der Pflanzenoberfläche oder die Induktion von Resistenzmechanismen.

Eigene Versuche

In den letzten Jahren wurden auch im Institut für Phytopatholo-

gie Aschersleben Untersuchungen zur Biologischen Bekämpfung des Feuerbrandes aufgenommen. Zunächst konnten aus der Epiphytenflora von Apfelbäumen ca. 100 im Plattentest aktive Hemmstoffbildner gewonnen werden. Die eigentliche Bewertung der antagonistischen Leistung gegenüber *E. amylovora* erfolgte im Birnenfruchttest nach ISENBECK (1983). Vergleichsweise wurden auch einige definierte *E. herbicola*- sowie zwei avirulente *E. amylovora*-Stämme auf ihre Hemmwirkung gegen Feuerbrand geprüft. Dabei zeigte sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration bei bestimmten Antagonisten, insbesondere dem Isolat 081, eine weitgehende Unterdrückung der Feuerbrandsymptome auf den geprüften Birnenfrüchten (Tab. 1).

Tabelle 1:

Einfluß einer Antagonistenapplikation im Birnenfruchttest
- Laborversuch 1988 -

Antagonistenstämme	Konzentration	Befallsindex**)	Wirkungsgrad (nach ABBOTT) (%)
<i>Erwinia amylovora</i> -	10 ⁷	n.g.	
Kontrolle	10 ⁹	100	-
<i>E. herbicola</i>	10 ⁷	66	34
112Y	10 ⁹	49	51
016	10 ⁷	69	31
	10 ⁹	54	46
021	10 ⁷	74	20
	10 ⁹	45	55
081	10 ⁷	30	70**)
	10 ⁹	0,1	99**)
089	10 ⁷	50	50
	10 ⁹	27	73

n.g. = nicht geprüft

*) Befallsindex nach Townsend und Heuberger

**) statistisch gesichert ($\alpha = 0,05$)

Von 1987 bis 1990 wurden regelmäßig Freilandversuche mit künstlich infizierten Blüten und Trieben (Sorte 'Idared') durchgeführt. Im Falle der Blütenbehandlungen zeigten sich große Unterschiede in Abhängigkeit vom Versuchsjahr und vom Behandlungszeitpunkt (= Antagonistenapplikation vor, während oder nach der Inokulation).

Wegen Frostschädigung liegen von den Blütenversuchen nicht in jedem Jahr Versuchsergebnisse vor. Als Beispiele seien die 1989 bei Apfel (Abb. 1) und die 1990 bei Birne (Abb. 2) erzielten Resultate angeführt. In beiden Fällen brachte die prophylaktische Applikation der Antagonisten einen deutlich besseren Schutz vor Feuerbrandbefall als die simultane. Ferner wird deutlich, daß das im Birnenfruchttest (Labor) besonders wirksame Isolat 081 im Freiland keine stärkere Wirkung hatte als die anderen Teststämme.

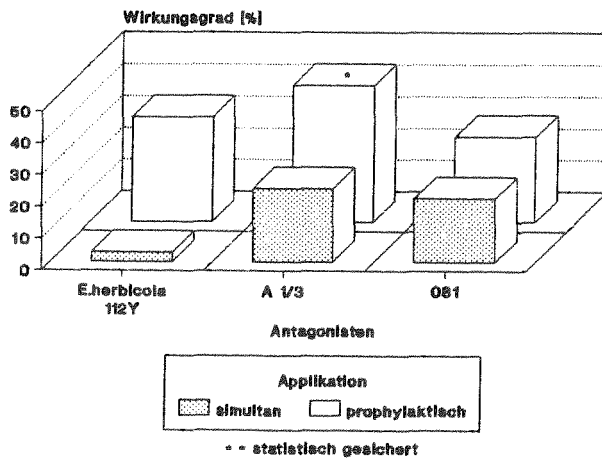


Abb. 1: Erwinia amylovora-Befall an Apfelblüten bei Antagonistenapplikation im Jahr 1989 (künstl. Infektion/n = 40 Blütenbüschel)

Im Falle von Triebbehandlungen ließen sich ebenfalls beträchtliche Unterschiede im Wirkungsgrad in Abhängigkeit vom Versuchsjahr und Behandlungszeitpunkt feststellen (Tab. 2). Daraus geht u.a. hervor, daß

- 1989 (bei besonders hohem Inokulationserfolg, der aber in der Abbildung nicht ersichtlich ist) eine erheblich geringere Behandlungsreduzierung nach Antagonistenanwendung eintrat als in anderen Jahren und
- sich nur die prophylaktische Anwendung der Antagonisten deutlich befallssenkend auswirkte.

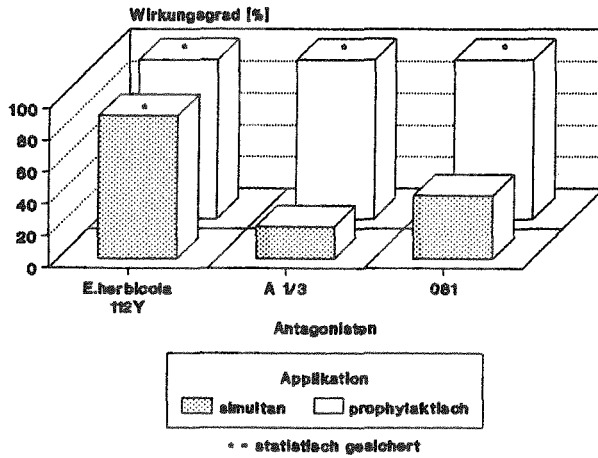


Abb. 2: Erwinia amylovora-Befall an Birnenblüten bei Antagonistenapplikation im Jahre 1990 (künstl. Infektion/n = 40 Blütenbüschel)

Tabelle 2:

Einfluß einer Antagonistenapplikation auf den Triebbefall
(n = 1988: 20 Triebe; 1989, 1990: 40 Triebe)
- Wirkungsgrad nach ABBOTT -

Antagonistenstämme	1988	1989	1990* ⁾	Bemerkungen
E. a.-Kontrolle	11 -	34 -	17 -	Anz.bef.Triebe Wirkungsgrad
<u>präinfektionelle Applikation</u> von				
E. herbicola 112Y	100** ⁾	23	91** ⁾	
A 1/3	n.g.	11	100** ⁾	
081	n.g.	6	82** ⁾	
<u>simultane Applikation</u> von E. herbicola 112Y				
A 1/3	66	23	18	
081	n.g.	11	45	
		n.g.	11	55

n.g. = nicht geprüft

*⁾ 1. Infektionstermin

**⁾ statistisch gesichert ($\alpha = 0,05$)

Für die Beurteilung der Eignung von Antagonisten zur Biologischen Bekämpfung spielt deren Beständigkeit am potentiellen Infektionsort (Blüte, Trieb) eine maßgebliche Rolle. Bei unseren

Erhebungen zeigten sich wiederum große Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsjahren und zwischen den Antagonisten: Als am beständigsten erwies sich das Isolat E. herbicola 112Y (bis zu 30 Tagen); Stamm 081 war dagegen in zwei Versuchsjahren jeweils nur wenige (3-5) Tage nachweisbar, im Jahre 1989 an Trieben aber 30 Tage.

Der Erreger wurde von keinem der Antagonisten in situ abgetötet; er konnte bis zu 40 dpi auf der Pflanzenoberfläche nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

1. Durch Applikation hochaktiver Antagonisten ließ sich der Feuerbrandbefall teilweise sehr stark reduzieren (bis zu 90 %).
2. Diese guten Versuchsergebnisse konnten aber nicht in jedem Jahr erzielt werden, der Bekämpfungserfolg war offenbar stark von den Witterungsbedingungen und dem Behandlungszeitpunkt abhängig.
3. Das deckt sich mit den Angaben anderer Autoren und mindert die Aussichten für einen praktischen Antagonisteneinsatz zur Feuerbrandbekämpfung in naher Zukunft erheblich. Eine reelle Perspektive würde sich dafür erst dann eröffnen, wenn hocheffektive Mikroorganismen gefunden würden, die zur Langzeitbesiedlung der Pflanzenoberfläche befähigt wären.

Literatur

- El-Goorani, M.A., and Beer, S.V.: Phytopathology 81 (1991), 121.
- Isenbeck, Margot: Entwicklung einer biologischen Bekämpfungsmethode gegen den Feuerbranderreger "Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al." an Ziergehölzen.
Diss. Christian-Albrechts-Univ. Kiel 1983, 158 S.
- Isenbeck, Margot, und Schulz, F.A.: Phytopathol. Z. 113 (1985), 324-333.
- Wodzinski, R.S.; Sobiczewski, P., and Beer, S.V.: Abstr. VI. Intern. Conf. on Plant Pathog. Bact., June 2-7, 1985, College Park, ML, 74-75.
- Zeller, W.: Der Feuerbrand des Kernobstes, hervorgerufen von Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al.
Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem H. 158 (1974), 121 S.

M. Sadowska-Rybak und D. Knösel

Institut für Angewandte Botanik, Abt. Pflanzenschutz, Hamburg

Nachweis des Feuerbranderreger (Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al.)
mit Hilfe des ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Eine rechtzeitige Erkennung des Feuerbrandes ist von großer Bedeutung. Problematisch bei der Diagnose ist die Abgrenzung zu anderen Erreger, vorallem *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, da er ähnliche Symptome hervorruft. Auch durch abiotische Einflußfaktoren wie Hitze, Trockenheit oder Herbizideinsatz können zu verwechselnde Symptome auftreten. Eine Unterscheidung von Saprophyten, die häufig auf Blattoberflächen anzutreffen sind wie z.B. *Erwinia herbicola* ist ebenfalls notwendig.

Der Nachweis des Feuerbranderreger erfolgt heute vorwiegend noch durch Isolierung auf selektiven Nährmedien mit nachfolgendem Pathogenitätstest auf den Birnenfrüchten. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig und in vielen Fällen nicht ausreichend spezifisch. Zudem ist der Birnentest nur in wenigen Monaten des Jahres durchführbar.

Zu den Methoden, die eine kurzfristige und präzise Diagnose ermöglichen, gehören serologische Nachweismethoden wie ELISA- und IMF-Tests. Mit beiden sollten die Spezifität und Nachweisempfindlichkeit für *Erwinia amylovora* überprüft und verbessert werden. Bisher kann man von einer breiten Anwendung der Serologie für diagnostische Zwecke im Bereich der Pflanzenbakteriologie noch nicht sprechen. Aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen mit verschiedenen Varianten des ELISA-Nachweisverfahrens wurde der indirekte ELISA-Test modifiziert und optimiert. Auf die weniger empfindlichen Varianten für den *Erwinia amylovora* Nachweis wie den direkten und "doppelsandwich" ELISA wurde in den weiteren Versuchen verzichtet.

Es wurden sowohl Bakteriensuspensionen als auch natürlich und künstlich infiziertes Pflanzenmaterial untersucht. Die Pflanzenproben stammten aus verschiedenen deutschen Instituten. Zu Vergleichszwecken dienten *Erwinia amylovora* Stämme aus England, den USA, Ägypten und aus der Türkei.

Da die Empfindlichkeit und Selektivität der serologischen Nachweismethoden in erster Linie von der Qualität des Antiserums abhängig sind, wurden hierfür mehrere Antiseren gegen verschiedene Bakterienantigene hergestellt und auf ihre antigenen Eigenschaften überprüft. Das Bakterium als ein Molekül verfügt über

mehrere Antigen determinanten auf seiner Oberfläche. Es mußte deshalb geklärt werden welche *Erwinia amylovora* spezifisch sind.

Es wurden folgende Antikörper durch das Immunisieren der Kaninchen gewonnen:

- ungewaschene Bakterien
- gewaschene, gefriergetrocknete Bakterien
- Membranproteine im Bereich von 39.000 Dalton

Die Membranproteine aus *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* und *Erwinia herbicola* wurden durch Zugabe von Enzymen, Gradientenzentrifugation und Aufschließung der Zellen getrennt und anschließend mit der SDS-PAGE Elektrophorese miteinander verglichen.

- Geißeln

Es ist weiter noch nicht genau untersucht worden, ob die Virulenz von *Erwinia amylovora* mit der Geißelentwicklung verbunden ist. Auf den Nährmedien verläuft die Entwicklung der Geißeln sehr unterschiedlich. Die Bakterien auf den festen Nährmedien haben meistens keine Geißel entwickelt. Um die Entwicklung zu stimulieren wurde das U-Röhrchen-Verfahren eingesetzt und verschiedene Wachstumsparameter überprüft. Die Geißeln bei sehr beweglichen Bakterien wurden abgeschert und durch mehrmalige Zentrifugation, Ammoniumsulfataussalzung und mittels DEAE-Cellulose gereinigt.

- Lipopolysaccharide

Mittels Ultrafiltration (100.000 Da) und Ultrazentrifugation (100.000 x g) wurden die Lipopolysaccharide von den extrazellulären Polysacchariden getrennt.

Die weitere Trennung von EPS erfolgte mittels DEAE-Cellulose. Die eventuell verbliebenen Restproteine wurden durch Phenolfällung und Chloramphenicol/Isopropanol beseitigt. Der indirekte Nachweis von LPS erfolgte durch KDO-Bestimmung, der Nachweis von EPS durch Anthron-Reaktion.

Aus Hühnereidotter wurden Antiseren gegen extrazelluläre Polysaccharide (reines Amylovorin) gewonnen. Dies erfolgt durch mehrmalige Zentrifugation unter Zugabe von PEG und anschließender Alkoholfällung. Die Untersuchungen zeigten, daß eine Antiserumherstellung gegen Amylovorin aufgrund des polysacchariden Charakters des Antigens nur mit Hühnern möglich war.

Unter Anwendung von Antikörpern gegen ungewaschene Bakterien, gegen Amylovorin mit Beimischung von Membranproteinen und gegen Amylovorin traten beim ELISA-Test Kreuzreaktionen mit *Pseudomonas syringae* und *Erwinia herbicola* auf. Die Nachweisgrenze unter Anwendung von Antikörper gegen gewaschene Bakterien und

gegen Membranproteine im Bereich 39.000 Da lag im Pflanzenmaterial bei 10^4 Bakterien/ml und in Bakteriensuspension nach zusätzlicher Zentrifugation, wodurch der Schleim entfernt wurde, bei 10^3 Bakterien/ml.

Parallel zum ELISA-Test wurde der indirekte serologische Test, der IMF-Test hinsichtlich seiner Eignung als schnelle, automatisierbare und sichere Nachweismethode überprüft. Die Kreuzreaktionen wurden ausschließlich mit Antikörpern gegen Amylovorin festgestellt. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 - 10^2 Bakterien/ml im Pflanzenmaterial und in der Bakteriensuspension, die Intensität der Fluoreszenz war jedoch unterschiedlich. Unter Anwendung von Antiseren gegen Membranproteine und gegen Geißeln war diese nicht so intensiv wie unter Anwendung der anderen Antikörpern.

Beide serologischen Testverfahren sind wegen ihrer-wenn auch unterschiedlich-hohen Spezifität, Sensitivität und leichten Durchführbarkeit nicht nur sehr geeignet für die Diagnose sichtbar erkrankter Pflanzen, sondern auch für den Nachweis eines latenten Befalls. Die Proben lassen sich mittels ELISA-Test innerhalb von 20 Stunden und mittels Immunfluoreszenz in weniger als 3 Stunden überprüfen. Das ELISA-Verfahren dauert zwar länger, ist aber bei großen Probenmengen gut automatisierbar.

Zur Absicherung der Nachweismethoden diente die SDS-Polyacrylamidelektrophorese. Anhand der Elektrophorese konnte *Erwinia amylovora*-Gruppe als homogen beschrieben werden und eindeutig von den Epiphyten und anderen Erregern, die an Kernobst ähnliche Schadsymptome verursachen, abgegrenzt werden. Die Versuche lassen erkennen, daß ELISA- und Immunfluoreszenz Tests entsprechend modifiziert für den Nachweis des Feuerbranderreger geeignet sind.

B. Steinbrenner, W. Zeller, K. Geider, P. Bellemann

*Biologische Bundesanstalt, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, 6915 Dossenheim;
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik, 6900
Heidelberg*

Zum Nachweis des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora* durch DNA-Hybridisierung

Der schnelle und sichere Nachweis des Feuerbranderregers (*Erwinia amylovora*) ist von großer Bedeutung für den praktischen Pflanzenschutz, z.B. bei frühem Befall im Reiserschnittgarten oder bei evtl. latenten Auftreten an importierten Wirtspflanzen (Kernobst und Ziergehölze). Die herkömmlichen Nachweismethoden, wie das Plattengußverfahren mit halbselektivem Medium und anschließender serologischer Bestimmung (Lelliot 1967, Zeller 1975) oder der Immunofluoreszenztest (IF-Test) bereiten immer noch erhebliche Schwierigkeiten wegen auftretender Kreuzreaktionen (Roberts 1980). Es wurde daher die DNA-Hybridisierung zur Identifizierung von *E. amylovora* überprüft und mit der zuletzt genannten Nachweismethode verglichen. Gleichzeitig wurde eine radioaktiv markierte Sonde mit einer durch Digoxigenin markierten DNA auf ihre Nachweisempfindlichkeiten verglichen.

Material und Methoden

Ein 5 kb großes *SalI*-Fragment aus einem 29 kb großen Plasmid von *E. amylovora*, das in allen von uns getesteten Stämmen nachgewiesen wurde, diente als spezifische Sonde (Falkenstein et al. 1988). Zum Nachweis wurden Bakterien aus potentiell befallenem Pflanzenmaterial auf StandardII-Agar ausplattiert, davon Kolonieabdrücke auf Nitrozellulose angefertigt und mit dem radioaktiv markierten 5 kb-Plasmid-Fragment hybridisiert. Zur Nicktranslation wurde ^{32}P markiertes Desoxynucleotidtriphosphat und DNA-PolymeraseI verwendet. Zum nicht-radioaktiven Nachweis wurden die Filter mit Antikörpern gegen Digoxigenin inkubiert, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Positive Kolonien zeigten eine typische blaue Anfärbung. Der Immunofluoreszenztest (IF-Test) erfolgte nach der EG-Methode von Van Varenberg *et.al.* (1987). An Hand einer Verdünnungsreihe mit einer Reinkultur von *E. amylovora* (Stamm Ea7/74) erfolgte die Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Koloniehybridisierung konnte noch eine unter ca. 100 Kolonien anderer Mikroorganismen auf der Agarplatte mit dem Nitrocellulose-Rundfilter nachgewiesen werden, vorausgesetzt, daß die Kolonien getrennt voneinander auf-

gewachsen waren. Bei zu starken Konzentrationen, z. B. der Bildung eines Bakterienrasens, ist kein Einzelnachweis mehr möglich.

Tab. 1 Vergleich der Nachweisgrenze von *E. amylovora* bei der DNA-Hybridisierung zu Immunfluoreszenzverfahren (IF-Test)

Bakt.Konz. per ml	DNA-Hybridisierung		Fluoreszenz IF-Test
	radioaktiv	nicht radioaktiv	
10 ⁷	++	++	++
10 ⁶	++	+	++
10 ⁵	++	(+)	+
10 ⁴	+		
10 ³	(+)		

Der direkte Nachweis aus einer Suspension oder Homogenat lag bei der Reinkultur für die Hybridisierung nach radioaktiver Methode bei 10⁴ Zellen, während die Anfärbung mit Digoxigenin 100fach weniger empfindlich war (Tab. 1). Dazwischen lag der IF-Test, wo bei 10³ Zellen pro 10 µl ein Nachweis möglich war. Hier treten jedoch bei der Bestimmung von Feldproben Probleme wegen Kreuzreaktionen mit anderen Pflanzen-assoziierten Bakterien, wie *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* u. a. auf. Weitere Vor- und Nachteile der überprüften Nachweismethoden sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2 Vor- und Nachteile von IF-Test und DNA-Hybridisierung

	IF-Test	Hybridisierung
Nachweisgrenze (in Reinkultur)	niedrig ca. 10 ³ Zellen/ 10 µl	ca. 10 ⁴⁻⁶ Zellen
Dauer	1 Tag	2-3 Tage
Arbeitsaufwand	gering	groß
Spezifität	je nach Anti- serum	sehr groß
Probleme	Kreuzreaktion möglich	(Radioaktivität) Kreuzreaktion nicht bekannt
Einsatzgebiet	Praxis (quantitativ)	Labor

Insgesamt gesehen kann der Nachteil der DNA-Hybridisierung in der Nachweisempfindlichkeit dadurch aufgehoben werden, daß sich durch Anreicherung über ein halbselektives Medium *E. amylovora* durch Koloniehybridisierung völlig sicher bestimmen läßt.

Literatur

- FALKENSTEIN, H., BELLEMANN, P., WALTER, S., ZELLER, W. AND GEIDER, K., 1988: Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA 29. Appl. Environm. Microbiol. 2798-2802.
- LELLIOT, R.A., 1967: The diagnosis of fireblight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. Europ. Mediterr. Plant Protect. Organ. Ser.A (45 E), 27-34.
- ROBERTS, P., 1980: Problems encountered during immunofluorescent diagnosis for fireblight. Plant Path. 29, 93-97.
- VAN VAERENBERG, J., DINESEN, I., ZELLER, W., ALIVIZATOS A., NOVAL C., CAUVEAU, J.F., HAYES, D., MAZZUCCHI, U., CONTER C., ASCHMAN, A., JANSE J., HENRIQUES, L., STEAD, D., 1987: Scheme for the detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Commission of the European Communities, Report, 21 pp.
- ZELLER, W., 1975: Anleitung zur Diagnose des Feuerbranderreger (*Erwinia amylovora*) (Burril, Winslow et al.). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 27, 20-22.

Stefan Bereswill, Armin Pahl, Peter Bellemann, Wolfgang Zeller* und Klaus Geider

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik, Jahnstr. 29, D-6900 Heidelberg, und *Biologische Bundesanstalt für Forst- und Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, D-6915 Heidelberg-Dossenheim

NACHWEIS UND ANALYSE VON *ERWINIA AMYLOVORA* MIT HILFE VON PCR UND RFLP

Der spezifische Nachweis eines Organismus mit molekularbiologischen Methoden setzt generell voraus, daß sein Genom DNA-Sequenzen trägt, die in anderen Organismen ganz fehlen oder dort durch Einflüsse der Evolution stark verändert sind. Pflanzenpathogene Bakterien der Art *Erwinia amylovora* enthalten das Plasmid pEA29, das den nahen Verwandten innerhalb der Gattung *Erwinia* (*Herbicola*- und *Carotovora*-Gruppe), sowie anderen Bakterienfamilien der epiphytischen und phytopathogenen Begleitflora fehlt. Plasmid pEA29 stellt so ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal dar, das den spezifischen Nachweis von *E. amylovora* auf molekularer Ebene möglich macht. In der Praxis können DNA-Sequenzen, die auf diesem Plasmid lokalisiert sind, als artspezifische Marker für die Verfahren der klassischen Nukleinsäurehybridisierung verwendet werden. Entsprechende Koloniehybridisierungsexperimente mit Fragmenten von pEA29 haben bereits gezeigt, daß *E. amylovora* durch das Plasmid pEA29 spezifisch detektiert werden kann (Falkenstein et al., 1988). Das ubiquitäre Vorkommen des Plasmids in allen bisher untersuchten natürlichen Isolaten des Feuerbranderreger spricht für eine positive Selektion der plasmidtragenden Bakterien in der Natur. Für diese Tatsache scheinen plasmidkodierte Stoffwechselfunktionen verantwortlich zu sein, die den Besitz des Plasmids zum Selektionsvorteil werden lassen (Falkenstein et al., 1989; Laurent et al., 1989).

Da die Methoden der klassischen Nukleinsäurehybridisierung sehr zeitaufwendig sind (3-6 Tage) und oft ein großes Maß an Erfahrung voraussetzen, eignen sie sich schlecht für einen routinemäßigen Nachweis des Feuerbranderreger. Die Entwicklung und Etablierung von einfachen, aber nicht weniger sensitiven Nachweismethoden ist daher für die Laborpraxis von Vorteil. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vereinigt die Vorteile der sensitiven Nukleinsäurehybridisierung mit einer einfachen und wenig zeitaufwendigen Methodik (weniger als 1 Tag) und erscheint deshalb für den routinemäßigen Einsatz in der Praxis sehr geeignet. Die Anwendung der PCR-Technik, für den einfachen und sensitiven Nachweis von *E. amylovora* *in vitro*, *in vivo* und *in planta*, soll im folgenden näher erläutert werden.

Das PCR-Nachweissystem für *E. amylovora*

Das PCR-Nachweissystem basiert, wie die oben angesprochenen Koloniehybridisierungsexperimente, auf dem Nachweis von Fragmenten des artspezifischen Plasmids pEA29. Da für die Amplifikation in der PCR kleine DNA-Fragmente besser geeignet sind als große, wurde ein 0,9 kb *Pst*I-Fragment des Plasmids an beiden Enden sequenziert und zwei 17 Bp-Sequenzen als Bindungsstellen für die anschließend synthetisierten Primer ausgewählt. Bei Verwendung dieser Primer wird in einer optimierten PCR mit *E. amylovora* Gesamt-DNA

als Target ein einziges 0,9 kb großes DNA-Fragment amplifiziert. Nachdem in einer Southern-Hybridisierung mit dem markierten *Pst*I-Fragment des Plasmids als Sonde sichergestellt wurde, daß das Amplifikationsprodukt mit der durch die Primer flankierten Sequenz im Plasmid des Bakteriums übereinstimmt (Pahl, 1991), konnte das System für weitere Experimente verwendet werden (Bereswill, Bellemann, Pahl, Zeller, Geider, Manuskript in Vorbereitung).

Die Speziespezifität des PCR-Detektionssystems

Zum Nachweis der Spezifität der verwendeten DNA-Sonden (Primer) wurde phenolgereinigte DNA aus verschiedenen phytopathogenen Bakterienspezies isoliert und in der PCR untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei Verwendung von DNA aus *E. amylovora*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* (*ssp. carotovora*, *atroseptica*), *Pseudomonas syringae* (*pv. syringae*, *glycinea*, *phaseolicola*) und *Agrobacterium tumefaciens*, keine PCR-Amplifikationsprodukte auftreten, die ebenso groß sind wie das durch die beiden Primer flankierte *Pst*I-Fragment von pEA29. *E. amylovora* kann also - mit den hier verwendeten Primern als Sonden - unabhängig von der Begleitflora sehr spezifisch detektiert werden. Ergänzend wurden Versuche durchgeführt, in denen *E. amylovora*-DNA in einem großen Überschuß an Fremd-DNA der o.g. Arten nachgewiesen werden konnte. Die hohe Speziespezifität des Systems wurde außerdem durch Experimente mit lebenden Zellen (siehe unten) und Zellgemischen bestätigt.

Der direkte Nachweis von *E. amylovora* *in vivo*

Weitere Untersuchungen mit dem an *E. amylovora* angepaßten PCR-System haben gezeigt, daß auch intakte Zellen aus Über-Nacht-Kulturen und von festen Medien direkt in die PCR eingesetzt und sehr sensitiv detektiert werden können. Dieser *in vivo*-Nachweis hat entscheidende Vorteile für die Praxis: So kann z.B. auf die zeitaufwendige Isolation von phenolgereinigter DNA verzichtet werden, die immer mit Verlusten verbunden ist und die Gefahr von Fremdkontaminationen erhöht. Die sensitive Detektion von lebenden Bakterien spielt aber insbesondere für den Nachweis des Feuerbranderreger *in planta* eine große Rolle. Das Bakterium kann direkt, ohne zeitaufwendige Vorkultivierung in Waschlösungen von Pflanzenteilen oder in Pflanzenexsudaten nachgewiesen werden.

Die Sensitivität des PCR-Nachweissystems *in vitro* und *in vivo*

Die Nachweisgrenze des Systems, die vor allem für die Feststellung des Feuerbranderreger *in planta* eine wichtige Rolle spielt, liegt bei 10 - 50 Bakterien. Dieser Wert wurde zunächst in Verdünnungsreihen von DNA-Präparationen ermittelt und konnte dann durch den Einsatz von intakten Bakterien in die PCR bestätigt werden. Dazu wurden - parallel zur PCR - Bakterienverdünnungen auf Standard I-Agar ausplattiert und anschließend gezählt.

Der Nachweis des Feuerbranderreger *in planta*

Für den Nachweis von *E. amylovora in planta* wurden junge Apfelpflanzen verwendet, die im Frühjahr dieses Jahres mit dem Erreger inokuliert worden waren. Die Untersuchungen beschränkten sich bisher auf inokulierte Blätter und Kankerzonen am Stamm, wobei nicht-inokulierte Blätter als Kontrollen verwendet wurden. Das so definierte Probenmaterial wurde mehrere Stunden gewaschen und die resultierende Bakteriensuspension anschließend zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann resuspendiert und direkt in die PCR eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, daß *E. amylovora* a) in Stammkankern (1g), b) in Stammkankern (50-100 mg) und in c) inokulierten Blättern zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Nichtinokulierte Kontrollblätter blieben stets negativ (Bereswill, Belle-mann, Pahl, Zeller, Geider; Manuskript in Vorbereitung). In ersten Experimenten zur quantitativen Rückgewinnung von Bakterien aus inokuliertem Blattmaterial konnten etwa 500 Bakterien sicher nachgewiesen werden.

RFLP-Analyse des Genoms verschiedener *E. amylovora*-Stämme

Da die genetische Homogenität verschiedener *E. amylovora* - Populationen für den Nachweis des Erregers mit der PCR-Technik eine entscheidende Rolle spielt, wurde eine RFLP-Analyse von *E. amylovora*-Stämmen aus verschiedenen geographischen Regionen durchgeführt. Die RFLP-Analyse erlaubt die Detektion von evolutionär bedingten Veränderungen des Genoms auf molekularer Ebene. Dabei können Insertionen, Deletionen und (bei Veränderung einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym) sogar Punktmutationen in der DNA erkannt werden. Man macht sich dabei die Tatsache zunutze, daß durch Insertionen oder Deletionen in der DNA die Länge von Restriktionsfragmenten einzelner Genomteile vergrößert oder verringert wird. Die Untersuchung von Einzelgenen, Genclustern, Plasmiden oder repetitiven Sequenzen im Gesamtgenom, wird durch die spezifische Hybridisierung der restringierten DNA mit komplementären, radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierten DNA-Sonden ermöglicht.

Zum Nachweis von RFLPs im artspezifischen Plasmid pEA29 wurde Gesamt-DNA aus verschiedenen Stämmen des Feuerbranderreger mit Restriktionsenzymen geschnitten und die so hergestellten Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde mit markiertem Plasmid pEA29 als Sonde hybridisiert um eventuell auftretende RFLPs im Plasmid nachweisen zu können. Die Gesamtpopulation verhält in Bezug auf die Plasmidstruktur sehr homogen, was bei der klonalen Verbreitung dieser in Mitteleuropa geschichtlich recht jungen Krankheit auch zu erwarten war. Eine Ausnahme bildet der Stamm E9 (von R. Goodman aus den USA), bei dem ein RFLP in einem *Pst*I-Fragment des Plasmids nachgewiesen werden konnte (Pahl, 1991).

Zusammenfassung

Durch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte der Feuerbranderreger *E. amylovora* sowohl bei Verwendung von isolierter DNA, als auch durch den direkten Einsatz von intakten Bakterien, in Kultur und *in planta* spezifisch und sensitiv nachgewiesen

werden. Die Detektion des Bakteriums mit der PCR-Technik bietet gegenüber anderen (z.B. serologischen) Nachweismethoden einige Vorteile. Hier sind vor allem der geringe Zeitaufwand (6-8 Stunden), und die hohe Speziespezifität des Systems zu nennen, das sich zusätzlich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet. Eine entscheidende methodische Verbesserung konnte durch den direkten Nachweis von intakten Bakterien erreicht werden. Dadurch wird vor allem der Nachweis des Bakteriums im natürlichen Habitat (auf Pflanzenteilen) in der Praxis erheblich erleichtert. Durch RFLP-Analysen konnte gezeigt werden, daß die Struktur des artspezifischen Plasmids pEA29, das die Grundlage des PCR-Nachweises bildet, in der natürlichen Gesamtpopulation des Erregers sehr homogen ist. Das bedeutet für die PCR-Technik, daß auch Neuisolate mit dieser Methode schnell und einfach charakterisiert werden können.

Literatur

- FALKENSTEIN H, BELLEMANN P, WALTER S, ZELLER W, GEIDER K (1988). Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen by colony hybridisation with DNA from plasmid pEA29. *Applied and Environmental Microbiology* 54 : 2798-2802.
- FALKENSTEIN H, ZELLER W, GEIDER K (1989). The 29 kb plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fireblight symptoms. *J. General Microbiology* 135: 2643-2650.
- LAURENT J, BARNY M-A, KOTOJANSKY A, DUFRICHE P, VANNESTE JL (1989). Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 160-164.
- PAHL A (1991). Nachweis und Charakterisierung des *Erwinia amylovora* Genoms durch PCR und RFLP-Analysen. Diplomarbeit Universität Heidelberg.

Klaus Geider

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik, Jahnstr. 29,
D-6900 Heidelberg

FAKTOREN FÜR DIE WECHSELWIRKUNG VON *ERWINIA AMYLOVORA* MIT PFLANZEN

Um den Feuerbrand (ZELLER, 1974; VAN DER ZWET und KEIL, 1979; GEIDER, 1990) auf Wirtspflanzen auszubreiten, müssen diese von *Erwinia amylovora* kolonisiert und schließlich geschädigt werden. Molekular-genetische Untersuchungen haben das Verständnis für die Voraussetzungen im bakteriellen Stoffwechsel in den letzten Jahren erweitert. Außerdem liefert die Molekularbiologie DNA-Sonden (FALKENSTEIN et al., 1988) und andere Methoden, um den Feuerbranderreger spezifisch und empfindlich nachzuweisen und Isolate auf Grund ihrer Hybridisierungssignale zu differenzieren. Die DNA-Hybridisierungen mit radioaktiv und nicht-radioaktiv markierten Sonden werden in diesem Heft an anderer Stelle diskutiert wie auch der Nachweis von *E. amylovora* durch Amplifikation definierter Fragmente in einem DNA-Gemisch mit Hilfe der PCR-Methode (polymerase chain reaction). Außerdem wurde untersucht, inwieweit sich *E. amylovora*-Isolate durch Hybridisierungen mit Sonden aus dem Bakterien-Genom bzw. durch unspezifische Sonden aus repetitiven Sequenzen unterscheiden lassen.

Durch Transposon-Mutagenese wurden apathogene *E. amylovora*-Mutanten erzeugt und charakterisiert (s. Beitrag von BELLEMANN et al.). Mutanten mit verminderter Virulenz wurden durch Inaktivierung des Gens für Levan-Sucrase (s. Beitrag von GEIER und GEIDER), aber auch mit Defekten in der Regulation der EPS-Synthese (BERNHARD et al., 1990) oder durch Entfernen des 29 kb großen *E. amylovora*-Plasmids (FALKENSTEIN et al., 1989) erzeugt.

Pflanzenzellen können entweder das Bakterienwachstum hemmen und das Pathogen abwehren (Nicht-Wirtspflanzen) oder vom Pathogen besiedelt werden (Wirtspflanzen). In beiden Fällen sind für Bakterien und Pflanzenzellen zahlreiche Wechselwirkungen erkennbar, die in diesem Beitrag diskutiert werden sollen.

Apathogene Mutanten

Der Erreger des Feuerbrands wurde bisher meist aus Pflanzen mit Krankheitssymptomen isoliert und durch Virulenztests, auf selektiven Platten und mit Immunfluoreszenz identifiziert. Apathogene Mutanten wurden gelegentlich im Labor beobachtet. Auf Saccharosehaltigem Agar sind mitunter nicht-schleimende Kolonien zu erkennen, die in der Synthese des Exopolysaccharids Levan gestört sind. Die von R. Goodman isolierte Mutante E8 hat außerdem einen Defekt in der Synthese von Amylovoran, dem heterogenen Polymer von *E. amylovora* (AYERS et al., 1979). Die spontane Mutante P66 ist nicht in der Lage, bei Nicht-Wirtspflanzen eine hypersensitive Reaktion (HR) hervorzurufen (WALTERS et al., 1990). Damit sind zwei wichtige Typen von Mutanten gekennzeichnet. Fehlen der Schleimbildung und der Verlust der Fähigkeit, bei Nicht-Wirtspflanzen HR hervorzurufen, führen auch bei molekular-genetisch erzeugten Transposon-Mutanten zu apathogenen Mutanten.

Meist wurden die Mutanten durch Insertion des Transposons Tn5 oder Derivaten des Bakteriophagen Mu erzeugt. Neben Defekten in der EPS-Synthese und in der HR-Induktion wurden auch Mutanten für die Eisenaufnahme (Siderophore) (VANNESTE et al., 1990) und der Aminosäure-Synthese (Auxotrophie) beschrieben (BELLEMANN und GEIDER, zur Veröffentlichung eingereicht).

Abschwächung der Virulenz

In allen von uns untersuchten Isolaten des Feuerbranderreger ist ein 29 kb großes Plasmid vorhanden (FALKENSTEIN et al., 1988). Im Stoffwechsel der Bakterienzelle ist es an der Thiaminsynthese (Vitamin B₁)-Synthese beteiligt (LAURENT et al., 1989). Im Labor erzeugte Plasmid-freie Stämme sind auf unreifen Birnen und Birnensämlingen weniger virulent als der Elternstamm (FALKENSTEIN et al., 1989). Mutanten im Genabschnitt für Levansucrase können sich ebenfalls auf Saccharose-haltigen Trieben von Birnensämlingen schlecht ausbreiten (s. Beitrag von GEIER UND GEIDER). Die Expression des Enzyms ist konstitutiv in *E. amylovora*, sie scheint jedoch auch vom *rcaA*-Protein, einem Aktivator der EPS-Synthese, beeinflusst zu werden (BERNHARD et al., 1990). Neben der Sekretion von Levansucrase werden von *E. amylovora* auch Proteasen ausgeschieden (SEEMÜLLER und BEER, 1977). Mutanten mit Defekten in der Amylovoran-Synthese produzieren keine aktive Protease II, jedoch wird dieser Ausfall durch genetische oder biochemische Restaurierung der EPS-Synthese behoben (unveröffentlicht). Protease könnte bei der Entstehung von Feuerbrandsymptomen eine begleitende Rolle spielen, wie es auch für das Phytotoxin Dihydroalanin (DHP) beobachtet wurde (SCHWARTZ et al., 1991). DHP wird nur von einigen *E. amylovora*-Stämmen produziert, ohne daß diese in der Ausprägung von Krankheits-symptomen stark verändert sind.

Gene mit Einfluß auf die Regulation der Amylovoran-Synthese verändern die Entstehung von Krankheitssymptomen durch *E. amylovora*. Aus Daten von *E. coli* und *E. stewartii* ist zu schließen, daß es mehrere Regulator-Gene für die Synthese von Kapselpolysaccharide von Gram-negativen Bakterien gibt (COOK und COPLIN, 1990). Bei *E. amylovora* haben wir das *rcaA*-Genprodukt als einen Regulator für die Amylovoran-Synthese charakterisiert (BERNHARD et al., 1990). Transposon-Mutanten im *rcaA*-Gen zeigen herabgesetzte Virulenz und können durch die entsprechenden Gene aus *E. stewartii* und *E. coli* teilweise komplementiert werden. Die Sequenz des *rcaA*-Gens hat große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Gen aus den beiden anderen Organismen, ist also für Gram-negative Bakterien konserviert.

Pflanzliche Abwehrreaktionen

Pflanzen haben zahlreiche Strategien entwickelt, um pathogene Organismen zu erkennen und sie möglichst an der Kolonisierung des Pflanzengewebes zu hindern. Die Induktion von frühen Abwehrreaktionen wie die Phenylalanin-Ammonium-Lyase Expression (PAL), die Bildung von Phytoalexinen und die hypersensitive Reaktion (HR) spielen dabei eine wesentliche Rolle (HAHLBROCK und SCHEEL, 1987).

HR ist an einen Genabschnitt des *E. amylovora*-Chromosoms gebunden, der kloniert und in *E. coli* transferiert wurde (BAUER und BEER, 1991). Damit kann *E. coli* auf der

Pflanze HR auslösen. Die einzelnen molekulare Vorgänge in der Pflanzenzelle sind für HR noch unklar, jedoch ist die Fähigkeit von Bakterien, sich im Gewebe von Nicht-Wirtspflanzen zu vermehren, wichtig. PAL steht am Anfang von zahlreichen weiteren Schritten, die zu pflanzlichen Reaktionen gegenüber dem Pathogen führen. Während Amylovoran oder Wildtyp-Bakterien bei kultivierten Birnenzellen keine PAL-Induktion hervorrufen, ist die kapsellose Mutante M1 (*galE*) ein Induktor der PAL-Synthese (Metzger, Schwartz, Geider, unveröffentlicht).

Phytoalexinbildung kann besonders einfach an kultivierten Petersiliezellen gemessen werden. Amylovoran ist ein Induktor dieser Synthese, während andere Polysaccharide diesen Effekt bei Zellen von Persilie als Nicht-Wirtspflanze nicht hervorriefen (SCHWARTZ und GEIDER, unveröffentlicht). Es bleibt offen, ob Amylovoran direkt oder Begleitstoffen für diesen Effekt verantwortlich sind.

Amylovoran ist bei kultivierten Birnenzellen nicht in der Lage, Abwehrreaktionen zu induzieren, wie es oben für die PAL-Induktion bei Petersiliezellen beschrieben wurde. EPS scheint daher für Wirtspflanzen eine wichtige Rolle für die Maskierung des Pathogens zu spielen. Andererseits können Pflanzenstoffe wie organische Säuren (Maleinsäure), Zucker (Sorbit, Fruktose) oder Aminosäuren (Aspargin auf *E. amylovora* chemotaktisch (RAYMUNDO und RIES, 1980) oder bei der Expression von Reporter-Genen (CHANG und GEIDER, unveröffentlicht) aktiv sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Apathogene Mutanten des Feuerbrandreggers *E. amylovora* sind oft nicht mehr in der Lage, ein saures Exopolysaccharid, das Amylovoran, zu synthetisieren oder an Nicht-Wirtspflanzen HR zu induzieren (Tabelle 1). Regulationsmutanten der EPS-Synthese und Stämme ohne ein 29 kb großes Plasmid sind in der Bildung von Krankheitssymptomen abgeschwächt. Bei Abwehrreaktionen von kultivierten Pflanzenzellen wurden die Wirkung von EPS und von *E. amylovora*-Mutanten auf Phytoalexinbildung und PAL-Induktion gemessen. Während Birnenzellen im allgemeinen für *E. amylovora* und dessen Polysaccharide unempfindlich sind, reagieren Petersiliezellen durch Phytoalexininduktion auf die Zugabe von Amylovoran. Die bakterielle Kapsel scheint das Bakterium bei Wirtszellen vor Erkennen als Pathogen zu schützen.

Tabelle 1: *E. amylovora*-Mutanten mit Defekten bei der Ausbildung von Feuerbrand-symptomen

Phänotyp apathogener Mutanten:	Teilvirulente Mutanten:
1) keine EPS-Synthese (Amylovoran)	1) Verlust von 29 kb Plasmid
2) ohne hypersensitive Reaktion (HR) oder defekte <i>dsp</i> -Gene	2) keine Levan-Sucrase
3) keine Bildung von Siderophoren (Eisen-Aufnahme)	3) kein Dihydrophenylalanin
4) Verlust einiger Stoffwechsel-Syntheseleistungen	4) ohne Protease Sekretion?
	5) ohne Aktivator für EPS-Synthese

LITERATUR

- AYERS AR, AYERS SB, GOODMAN RN (1979). Extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*: A correlation with virulence. *Applied Environmental Microbiology* 38: 659-666.
- BAUER DW, BEER SV (1991). Further characterization of an *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 493-499.
- BERNHARD F, POETTER K, GEIDER K, COPLIN DL (1990). The *rcsA* gene from *Erwinia amylovora*, Identification, nucleotide sequence, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 429-437.
- COPLIN D, COOK D (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 271-279.
- FALKENSTEIN H, BELLEMANN P, WALTER S, ZELLER W, GEIDER K (1988). Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2798-2802.
- FALKENSTEIN H, ZELLER W., GEIDER K (1989). The 29 kb plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fireblight symptoms. *J. General Microbiol.* 135: 2643-2650.
- GEIDER K (1990). Der Feuerbrand des Kernobstes: Molekulare Biologie des Erregers *Erwinia amylovora* (The fireblight of pome fruits: Molecular biology of the pathogen *Erwinia amylovora*). *forum microbiologie* 13: 282-295.
- HAHLBROCK K, SCHEEL D (1987). Biochemical responses of plants to pathogens. In: Innovative approaches to plant disease control (I. Chet, Editor), J. Wiley & Sons, Inc. (New York - London - Sydney - Toronto) pp. 229-254.
- LAURENT J, BARNY M-A, KOTOUJANSKY A, DUFRICHE P, VANNESTE JL (1989). Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2: 160-164.
- RAYMUNDO AK, RIES SM (1980). Chemotaxis of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 70: 1066-1069.
- SCHWARTZ T, BERNHARD F, THEILER R, GEIDER K (1991). Diversity of the fire blight pathogen in production of dihydrophenylalanine, a virulence factor of some *Erwinia amylovora* strains. *Phytopathology* 81: 873-878.
- SEEMÜLLER EA, BEER SV (1977). Isolation and partial characterization of two neutral proteases of *Erwinia amylovora*. *Phytopath. Z.* 90: 12-21.
- VANNESTE JL, PAULIN J-P, EXPERT D (1990). Bacteriophage Mu as genetic tool to study *Erwinia amylovora* pathogenicity and hypersensitive reaction on tobacco. *Journal of Bacteriology* 172: 932-941.
- VAN DER ZWET T, KEIL HL (1979). Fire blight, a bacterial disease of rosaceous plants. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook Number 510, pp. 200.
- WALTERS K, MAROOFI A, HITCHIN E, MANSFIELD J (1990). Gene for pathogenicity and ability to cause the hypersensitive reaction cloned from *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 509-521.
- ZELLER W (1974). Der Feuerbrand des Kernobstes hervorgerufen von *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft 158, 121 pp.

Peter Bellemann, Frank Bernhard, Marianne Metzger und Klaus Geider

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik, Jahnstr. 29,
D-6900 Heidelberg

DIE ROLLE VON EXOPOLYSACCHARIDEN BEI *ERWINIA AMYLOVORA*

Bakterielle Polysaccharide

Phytopathogene Bakterien produzieren eine Vielzahl von Polysacchariden, die als Kapsel in Erscheinung treten bzw. als extrazelluläre Polysaccharide (EPS) in die Umgebung abgegeben werden. Obwohl sie schon frühzeitig nachgewiesen wurden, ist ihre Bedeutung als Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor erst in neuerer Zeit genauer dokumentiert worden. Ihre konkrete Funktion im Pathogenitätsprozess ist noch nicht eindeutig geklärt. Als Beispiele seien hier einige Bakterienarten aufgeführt, bei denen der Synthese von Exopolysacchariden eine Bedeutung bei der Pathogenese beigemessen wird: *Erwinia stewartii*, ein Pathogen an Mais, synthetisiert ein Exopolysaccharid, das aus Glucose, Galaktose und Glucuronsäure besteht (Coplin *et al.*, 1986); *Pseudomonas solanacearum*, der Verursacher der Bakterienwelke an einer Vielzahl wichtiger Kulturpflanzen, synthetisiert ein hochmolekulares EPS, das hauptsächlich aus *N*-Acetylgalactosamin besteht (Cook und Sequiera, 1991) und auch *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ein Pathogen hauptsächlich an *Brassica*-Arten, produziert ein komplexes Exopolysaccharid, Xanthan, das aus einer Pentasaccharid-Grundeinheit mit der Zusammensetzung Glucose, Mannose, Glucuronsäure, Acetat und Pyruvat besteht (Harding *et al.*, 1987);

Für den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* sind außer einem Lipopolysaccharid (LPS) verschiedene Exopolysaccharide beschrieben worden: Amylovoran, das auch als EPS im engeren Sinne bzw. als Amylovorin bezeichnet wird (Goodman *et al.*, 1974; Bennet and Billing, 1978) und Levan (Groß *et al.*, 1989;

Die Struktur eines LPS-Typs von *E. amylovora* ist bestimmt worden und stellte sich für verschiedene *E. amylovora*-Isolate als ähnlich heraus (Ray *et al.*, 1986). Es besteht aus einem "core" Oligosaccharid aus Octonsäure (KDO), Heptose, Glucose und Aminozuckern das mit weiteren Oligosacchariden, bestehend aus Fucose, D-Galaktose und D-Glucose verknüpft ist (Ray *et al.*, 1987). Mutanten, die spezifische Defekte in der LPS-Biosynthese aufweisen, sind noch nicht isoliert worden. Dadurch ist die Bedeutung des LPS für den Krankheitsprozess noch unklar. Das Exopolysaccharid Amylovoran, auf das nachfolgend eingegangen wird, ist am Verlauf der Bakteriose direkt beteiligt: alle bisher untersuchten Amylovoran-negativen *E. amylovora*-Stämme sind apathogen.

Biochemische Charakterisierung des Amylovorans

Im Verlauf einer Feuerbrandinfektion tritt unter günstigen Bedingungen an den Pflanzen ein Exsudat in Form von Schleimtröpfchen oder Fäden auf (Ehrig und Ficke, 1987; Ehrig *et al.*, 1987). Dieses Exsudat besteht aus einer Polysaccharidmatrix in die

Bakterienzellen eingebettet sind. Das Polysaccharid des Exsudats ist in seinen Komponenten identisch mit dem Exopolysaccharid, das in Suspensionskultur gebildet wird und mit der Kapsel, die *E. amylovora* in Minimalmedium synthetisiert (Bennet and Billing, 1980). Das Exopolysaccharid kann aus dem zellfreien Überstand einer Suspensionskultur nach Ethanol-fällung isoliert werden. Das Vorhandensein einer Kapsel ist durch Negativ-Kontrastierung mit Tusche im Lichtmikroskop (Bennet and Billing, 1978), sowie durch Rutheniumrot (Politis and Goodman, 1980) und kationisches Ferritin im Elektronenmikroskop nachweisbar (unveröffentlicht). Hydrolyse- und NMR-Daten deuten auf eine Zusammensetzung des Polysaccharids aus Galactose, Glucose und Glucuronsäure hin. Ob Glucose tatsächlich Bestandteil des Amylovorans ist, ist noch umstritten. Ein Vorschlag zur Struktur meint, daß es sich aus einem sich wiederholenden verzweigten Pentasaccharid ("repeating unit"), bestehend aus vier Galactose- und einem Glucuronsäuremolekül, sowie Acetat und Pyruvat aufbaut (Smith *et al.* 1990). Das Vorhandensein von Glucose in den untersuchten Proben wurde hierbei auf die Anwesenheit des ebenfalls von *E. amylovora* synthetisierten Glucans zurückgeführt. Das Molekulargewicht liegt im Bereich von 50 bis 150 MDalton. Typisch für dieses saure Polysaccharid ist seine hohe Viskosität (Sijan *et al.*, 1985).

Genetisch Charakterisierung eines Amylovoran-Genabschnitts

DNA-Bereiche, die in die Synthese oder Regulation von Amylovoran involviert sind, wurden durch zwei verschiedene Ansätze isoliert. Zum einen wurde mit einem *E. amylovora*-Wildtyp-Stamm eine Transposon-Mutagenese durchgeführt. Dazu wurde das Transposon Tn5 mittels verschiedener Suicid-Vektoren (pSUP201-Tn5, pTi::Tn5 und fd-Tn5) in die Bakterienzelle eingeführt und auf Integration des Transposons in die Gesamt-DNA der Zelle selektiert. Die DNA derjenigen Mutanten, deren Amylovoranproduktion reduziert bzw. nicht mehr vorhanden war, wurde näher charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß Insertionen des Transposons in vier verschiedenen *EcoRI*-DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe zu einem Verlust der Amylovoranbildung führen (Bellemann *et al.*, 1990; Bellemann und Geider; zur Veröffentlichung eingereicht).

In einem zweiten Ansatz wurden EPS-defekte Bakterien der verwandten Art *E. stewartii* mit einer Genbank aus *E. amylovora*-DNA komplementiert (Bernhard, Coplin, Geider, Manuskript in Vorbereitung). Auf diese Weise wurde ein ca. 15 kb großes *E. amylovora* *HindIII*-DNA-Fragment gefunden, das in der Lage war bei der Mehrzahl der bekannten *E. stewartii* EPS-Mutanten wieder einen EPS-positiven Phänotyp zu erzeugen. Wird dieses 15 kb DNA-Fragment mutagenisiert und die Mutation durch homologe Rekombination in das Genom von *E. amylovora* eingesetzt, zeigt eine Vielzahl der Mutanten einen Amylovoran-negativen Phänotyp.

Ein Vergleich, der durch die beiden Ansätze erhaltenen DNA-Fragmente ergab, daß drei der vier *EcoRI*-DNA-Fragmente aus dem ersten Ansatz in dem 15 kb *HindIII*-DNA-Fragment enthalten waren. Die Komplementationsanalyse dieses DNA-Abschnitts zeigte, daß auf ihm mindestens vier Komplementationsgruppen liegen, deren Ausfall einen Amylovoran-negativen Phänotyp bei *E. amylovora* zur Folge hat. Ob es sich bei diesen gefundenen Komplementationsgruppen um die Gene oder Operons handelt, die für die Synthese, die Modifikationen oder den Transport des Amylovorans verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Zumindest wurde bei eini-

gen *E. coli*-Serotypen eine derartige Einteilung der Gen-Abschnitte für die Synthese von Kapselpolysacchariden bestimmt (Boulnois *et al.*, 1987).

Die Identifizierung des Gens für die Galaktose-Epimerase, *galE*, sowie des Regulator-Gens *rcaA*, die beide nicht auf dem klonierten 15 kb DNA-Fragment liegen, zeigt jedoch, daß nicht alle Gene, die für die Amylovoransynthese bzw. -regulation benötigt werden, benachbart vorliegen. Die UDP-Galactose 4-Epimerase bildet aus UDP-Glucose UDP-Galactose und liefert so aktivierte Galactose, einen Grundbaustein des Amylovorans (Metzger, Bellemann, Geider; Manuskript in Vorbereitung).

Regulation der Amylovoransynthese

Die Amylovoransynthese in *E. amylovora* ist komplex reguliert. Es scheinen sowohl positive als auch negative regulatorische Komponenten vorhanden zu sein. Wachsen die Bakterien in einem Vollmedium, ist die Synthese des Exopolysaccharids reprimiert. In Minimalmedium findet sie konstitutiv statt, und in Pflanzenmaterial steigt sie um das siebenfache an (Bennet und Billing, 1978). Bisher konnte ein Gen, *rcaA*, aus *E. amylovora* kloniert werden, das für ein Protein kodiert, das eine sehr hohe Homologie zu den RcsA Proteinen von *E. coli*, *E. stewartii* und *Klebsiella pneumoniae* aufweist (Bernhard *et al.*, 1990). Ist das *rcaA* Gen auf einem Multicopyplasmid in *E. amylovora* vorhanden, werden sowohl die Amylovoran- als auch die Levansynthese stimuliert (Bernhard *et al.*, 1990). Ein defektes *rcaA*-Gen führt zu einer Verminderung der Amylovoransynthese und infolgedessen zu einer Abschwächung der Virulenz bei *E. amylovora*. In *E. coli* sind neben dem *rcaA* Gen noch drei weitere regulatorische Gene der Kapselbiosynthese beschrieben worden: *rcaB*, *rcaC* und *lon* (Gottesman *et al.*, 1985; Brill *et al.*, 1988). Das RcsA Protein, das durch die Lon Protease gespalten werden kann, stimuliert zusammen mit dem RcsB Protein die Transkription der Kapselsynthese-Gene (Stout *et al.*, 1991). Es wird angenommen, daß die RcsB und RcsC Proteine ein regulatorisches Zwei-Komponentensystem bilden. Dabei könnte das RcsC Protein als Sensor gegenüber Umweltstimuli funktionieren und das RcsB Protein so modifizieren, daß es als Effektor die Kapselbiosynthese stimuliert (Stout and Gotteman, 1990). Ein ähnliches regulatorisches System erwartet man bei *E. amylovora*.

Funktionen des Amylovorans

Während die Bedeutung des bakteriellen Exsudats für die epidemiologische Verbreitung des Feuerbrandreggers bekannt ist (Zeller, 1974), kann über die genaue Funktion des Amylovorans während des Infektionprozesses nur spekuliert werden. Der ursprüngliche Befund, es handle sich um ein wirtsspezifisches Toxin (Goodman, 1974) konnte nicht bestätigt werden. Schon lange diskutiert man eine Restriktion des Wassertransports im Leitgewebe der Wirtspflanzen (Sijam *et al.*, 1985). Auch soll das Quellungsvermögen des Amylovorans zu einem Kollaps des die Bakterien umgebenden Wirtszellgewebes führen (Schouten, 1988). Weiterhin verhindert oder verzögert das Amylovoran durch eine Maskierung der bakteriellen Zellwand die Erkennung des Pathogens durch die Pflanzenzelle. Dadurch setzt keine oder nur eine verzögerte

Pflanzenabwehr ein. Alternativ könnte das Amylovoran Rezeptorstellen in der pflanzlichen Zellwand blockieren und so eine Erkennung verhindern. Für solche Modelle spricht der Befund, daß Wildtyp-Bakterien oder Amylovoran allein bei Birnenzell-suspensionskulturen keine Induktion der Phenylammoniumlyase (PAL), hervorrufen. Ganz im Gegensatz zu einer kapsellosen Mutante, die eine PAL-Induktion hervorruft (Metzger M., unveröffentlicht). Auch scheint der spezifischen Struktur des Amylovorans eine Bedeutung zuzukommen. Komplementiert man Amylovoran-negative Mutanten mit einem DNA-Abschnitt aus *E. stewartii*, der Gene für die Synthese eines *E. stewartii* spezifischen sauren Exopolysaccharids trägt, synthetisieren diese Mutanten wieder ein Exopolysaccharid, das aber verschieden von Amylovoran ist. Auf diese Weise komplementierte Mutanten sind nicht mehr pathogen (Bernhard, Coplin, Geider; Manuskript in Vorbereitung). Das bedeutet, daß eine spezifische Struktur in dem sauren, hochmolekularen Exopolysaccharid vorhanden sein muß, um den Infektionsprozess zu ermöglichen. Dies spricht gegen unspezifische Wirkungen des Amylovorans im Verlauf der Pathogenese.

Aufklärung des Synthesewegs

Die Bedeutung des Amylovorans als Pathogenitätsfaktor erfordert eine detaillierte Analyse seiner Biosynthese. Erst durch Kenntniss der einzelnen Syntheseschritte, von der Bereitstellung aktivierter Monozucker, über die Synthese der Grundeinheit an einem Lipidträger, deren Modifikation, die Ausschleusung durch die innere und äußere Membran und die Verknüpfung zu einem hochmolekularem spezifischen Polymer, ergeben sich neue Möglichkeiten zu einer Bekämpfung des Feuerbrands. Diese liegen in der Charakterisierung von Substanzen, die einzelne Syntheseschritte in der Amylovoransynthese blockieren.

LITERATUR

- BELLEMANN P, JAHN N, THEILER R, GEIDER K. 1990. Transposon Mutagenesis of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae 273:233-237.
- BENNET RA, BILLING E. 1978. Capsulation and virulence in *E. amylovora*. Ann. appl. Biol. 89:41-45.
- BENNET RA, BILLING E. 1980. Origin of the Polysaccharid Component of Ooze from Plants Infected with *Erwinia amylovora*. J General Microbiology 116:341-349.
- BERNHARD F, POETTER K, GEIDER K, COPLIN DL. 1990. The *rca* A gene from *E. amylovora*: identification, nucleotide sequence, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:429-437.
- BOULNOIS GJ, ROBERTS IS, HODGE R, HARDY K, JANN K, TIMMIS KN. 1987. Further analysis of the cloned K1 capsule biosynthesis genes of *E. coli*: definition of three functional regions for capsule production. Mol. Gen. Genet. 200:242-246.
- BRILL JA, QUINLAN-WALSHE C, GOTTESMAN S. 1988. Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 179:2599-2611.

- COOK D, SEQUIERA L. 1991. Genetic and Biochemical Characterization of a *Pseudomonas solanacearum* Gene Cluster Required for Extracellular Polysaccharide Production and for Virulence. *J Bacteriol* **173**:1654-1662.
- COPLIN DL, FREDERICK RD, MAJERCZAK DR, HAAS ES. 1986. Molecular cloning of virulence genes from *Erwinia stewartii*. *J Bacteriol*. **168**:619-623.
- EHRIG F, FICKE W. 1987. Rasterelektronenmikroskopische Bestimmung der Zeitspanne zwischen künstlicher Infektion von Apfeltrieben mit *E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **6**:505-508.
- EHRIG F, FICKE W, NACHTIGALL MW. 1987. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Entstehung der Bakterienfäden ("strands") beim Feuerbrand-*E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **6**:509-512
- GOODMAN RN, HUANG JS, HUANG PY. 1974. Host-specific phytotoxic polysaccharide from apple tissue infected by *E. amylovora*. *Science* **183**:1081-1082.
- GOTTESMAN S, TRISLER P, TORREWS-CABASSA A. 1985. Regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* **162**:1111-1119.
- GROSS M, RUDOLPH K. 1987. Demonstration of levan and alginat in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Phytopathology* **120**:9-19.
- GROSS M, GEIER G, GEIDER K, RUDOLPH K. 1989. Levan and levansucrase from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Budapest, Hungary, June 1989.
- HARDING NE, CLEARY JM, CABANAS DK, ROSEN IG, KAND KS. 1987. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol*. **169**:2854-2861.
- POLITIS DJ, GOODMAN RN. 1980. Fine Structure of Extracellular Polysaccharide of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* **40**:596-607.
- RAY TC, SMITH ARW, CARTER KJ, HIGNETT RC. 1986. Composition of lipopolysaccharides from four strains of *Erwinia amylovora*. *Journal of General Microbiology* **132**, 3159-3167.
- RAY TC, SMITH AR, WAIT R, HIGNETT RC. 1987. Structure of the sidechain of lipopolysaccharide from *Erwinia amylovora*. *European Journal of Biochemistry* **170**:357-361.
- SCHOUTEN HJ. 1988. Notes on the rolle of water potential in the pathenogenesis of fire blight, caused by *Erwinia mylovora*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **94**:213-220.
- SIJAM K, GOODMAN RN, KARR AL. 1985. The effect of salts on the viscosity and wilt-inducing capacity of the capsular polysaccharid of *Erwinia amylovora*. *Physiological Plant Pathology* **26**:231-239
- STOUT V, GOTTESMAN S. 1990. RcsB and RcsC: a two component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**:659-669.
- STOUT V, TORRES-CABASSA A, MAURIZI MR, GUTNIK D, GOTTESMAN S. 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol* **173**:1738-1747.
- ZELLER W. 1974. Der Feuerbrand des Kernobstes. Sammelreferat. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, Heft **158**.

Gebhard Geier und Klaus Geider

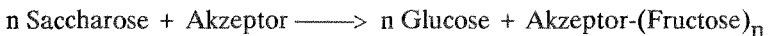
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Biophysik, Jahnstraße 29,
D-6900 Heidelberg

Die Levansucrase als Virulenzfaktor bei der Feuerbrandentstehung

Den extrazellulären Polysacchariden (EPS) vieler human-, tier- und pflanzenpathogener Bakterien wird vielfach eine Rolle als Virulenzfaktor zugeschrieben. *Erwinia amylovora* besitzt die Fähigkeit zur Synthese von mindestens zwei EPS-Typen (s. Beiträge von P. BELLEMANN und K. GEIDER). Neben dem sauren Heteropolysaccharid Amylovoran, ist auch die Produktion eines Homopolymers aus Fructose bekannt (BENNET und BILLING, 1980). Dieses Fructan konnte als typisches Levan (β -2,6-Fructofuranan) identifiziert werden (GROSS et al., 1990). Voraussetzung für die Levansynthese ist allerdings das Vorkommen von Saccharose im Kulturmedium.

Die Organe höherer Pflanzen bilden das einzige natürliche Habitat, in dem Saccharose in größeren Mengen vorkommt (Transport- und Speicherzucker). Die Produktion von Levan ist deshalb wohl auch bei einer ganzen Reihe von Bakterien verbreitet, die als Epiphyt, Bodenbakterium oder Pathogen in Kontakt zu Pflanzen stehen. Beispiele sind *Bacillus subtilis* (DEDONDER, 1966), *Actinomyces viscosus* (PABST et al., 1979), *Acetobacter suboxydans* (LOITSYANSKAYA et al., 1971), *Zymomonas mobilis* (LYNESS und DOELLE, 1983), *Pseudomonas phaseolicola* (GROSS und RUDOLPH, 1987) sowie *Erwinia herbicola* (COTE und IMAM, 1989).

In all diesen Fällen beruht die Levansynthese auf der Aktivität einer extrazellulären Levansucrase (β -2,6-D-Fructan:D-Glucose 6-Fructosyltransferase; E.C.2.4.1.10), die eine Transfructosylierungsreaktion bei gleichzeitiger Freisetzung von Glucose katalysiert:



Charakterisierung der Levansucrase

Auch in den Kulturfiltraten von *E. amylovora* ist eine beträchtliche Levansucrase-Aktivität nachweisbar. Das Enzym kann durch Anionenaustauschchromatographie angereichert und gereinigt werden. Unter vollständig denaturierenden Bedingungen weist es bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von 46 kD auf (GROSS et al., 1990). Bei der isoelektrischen Fokussierung des zur Homogenität gereinigten Enzyms treten zwei Protein-Banden mit isoelektrischen Punkten von 4,0 bzw. 3,6 auf, die beide Levansucrase-Aktivität aufweisen. Daten, die aus der heterologen Expression des klonierten Levansucrase-Gens in *E. coli* gewonnen wurden (s. unten), sprechen dafür, daß diese Aufspaltung nicht auf der Existenz von Isoenzymen beruht, sondern wahrscheinlich durch posttranslationelle Modifikationen des Enzyms verursacht wird.

Die Anwesenheit von Saccharose im Medium verursacht keine Zunahme der Enzymaktivität im Vergleich zu anderen C-Quellen wie Glucose, Sorbit oder Fructose (unveröffentlicht). Die Expression der Levansucrase bei *E. amylovora* unterliegt demnach keiner Substratinduktion sondern ist vielmehr konstitutiv. Allerdings gibt es Anzeichen für eine positive Regulation unter Mitwirkung des *rcaA*-Genprodukts, das auch bei der Amylovoran-Synthese als Regulator eingreift (BERNHARD et al., 1990).

Levansucrase-Mutanten und Virulenz

Die Bedeutung von Levan und Levansucrase für die Virulenz bzw. Pathogenität von *E. amylovora* wurde anhand geeigneter Transposon-Mutanten untersucht. Die Tn5-Mutagenese erfolgte mit Hilfe des Suicidvektors pfdA31-Tn5 (METZGER, BELLEMAN, SCHWARTZ und GEIDER, zur Veröffentlichung eingereicht), der über Elektroporation in einen virulenten Wildtyp-Stamm (Ea7/74) transferiert wurde, wo er aufgrund des fehlenden phagenspezifischen Gen-2-Replikationsproteins nicht replizieren kann.

Durch ein Vor-Screening auf Sucrose-haltigen Agarplatten sowie mit Hilfe genauerer enzymatischer Tests konnten unter 2000 untersuchten Tn5-Mutanten zwei Klone identifiziert werden, die einen vollständigen Ausfall der extrazellulären Levansucrase-Aktivität zeigten. Diese Levansucrase-Mutanten (LS6 und LS7) erwiesen sich als prototroph und produzierten normale Mengen an Amylovoran (unveröffentlicht).

Auf unreifen Birnenfrüchten erwiesen sich LS6 und LS7 als normal virulent und zeigten weder im Ausmaß noch im zeitlichen Ablauf der Symptomentwicklung (Schleimbildung) Unterschiede zum Wildtyp-Ausgangsstamm. Diese Beobachtung war zu erwarten, da im Bakterien-Schleim der inokulierten Früchte nur Amylovoran und kein Levan nachzuweisen ist. Außerdem enthält die aus dem Fruchtfleisch gewonnene Neutralzucker-Fraktion keine Saccharose als mögliches Substrat der Levansucrase (GEIER, 1989).

Im Phloemsaft von Rosaceen wurden dagegen (neben dem typischen Rosaceen-Transportzucker Sorbit) beträchtliche Mengen an Saccharose gefunden (KOLLAR und SEEMÜLLER, 1990). Um dies zu berücksichtigen, wurden weitere Virulenztests auf vollständigen Testpflanzen durchgeführt. Nach Inokulation in die grünen Triebspitzen von Birnensämlingen verursachten die Levansucrase-Mutanten LS6 und LS7 im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verzögerte Entwicklung und Ausbreitung der für den Feuerbrand typischen Nekrosen. Dies gilt vor allem für die frühe Phase (3 bis 7 Tage) nach der Inokulation. Nach dieser Verzögerung erreichen die von LS6 und LS7 befallenen Testpflanzen allerdings die volle Symptomstärke.

Die Levansucrase von *E. amylovora* ist also nicht essentiell notwendig für die Entstehung von Feuerbrand, sie kann jedoch in Trieben den zeitlichen Verlauf der Krankheit bzw. die Ausbreitung der Bakterien beeinflussen, so daß ihr definitionsgemäß eine Rolle als Virulenzfaktor zukommt.

Noch unzureichend geklärt ist die mögliche Rolle der Levansucrase bei der Primärinfektion über die Blüte. Saccharose ist ein Hauptbestandteil des Nektars bei Rosaceen und kann während Trockenphasen in beträchtlichen Konzentrationen auftreten

(BEUTLER, 1930; THOMSON, 1986; WILSON et al., 1990). Eine aktive Levansucrase könnte den Bakterien helfen, den mit hohen Saccharose-Konzentrationen verbundenen osmotischen Stress zu bewältigen, indem Saccharose in das osmotisch inaktive Polysaccharid Levan sowie in schnell zu metabolisierende Glucose umgewandelt wird.

Eine weitere Funktion des Levans könnte auch in der vielen bakteriellen Polysacchariden zugeschriebenen Schutzwirkung gegen Austrocknung liegen (MILLER und SCHROTH, 1972; WILSON et al., 1990).

Klonierung des Levansucrase-Gens

Ausgehend von den Levansucrase-Mutanten war eine Klonierung des chromosomalen DNA-Abschnitts möglich, der bei *E. amylovora* für dieses Enzym codiert. Durch Komplementations-Versuche konnte aus einer Cosmid-Genbank zunächst ein 9,8 kb großes DNA-Fragment isoliert werden, das bei den Levansucrase-Mutanten den Levan-positiven Phänotyp restaurieren konnte (unveröffentlicht). Subklonierungen erlaubten eine weitere Eingrenzung des eigentlichen Levansucrase-Gens auf einen 1,4 kb großen Bereich, dessen Sequenzierung in Arbeit ist.

Bei den Klonierungsarbeiten stellte sich heraus, daß das Levansucrase-Gen von *E. amylovora* in *E. coli* exprimiert werden kann. Eine aktive Sekretion des Enzyms wie vermutlich in *E. amylovora* erfolgt hier allerdings nicht.

Die durch heterologe Expression in *E. coli* gewonnene und gereinigte Levansucrase zeigt das gleiche Molekulargewicht (46 kD) wie das homolog in *E. amylovora* exprimierte Enzym (unveröffentlicht). Bei der isoelektrischen Fokussierung kommt es im sauren pH-Bereich ebenfalls zu einer Aufspaltung in zwei aktive Protein-Banden (s. oben). Da ein DNA-Fragment von 1,4 kb nicht für zwei Proteine mit je einem Molekulargewicht von 46 kD kodieren kann, muß man annehmen, daß die Levansucrase von *E. amylovora* in zwei posttranslationalen Modifikationen vorkommt, die bei Expression in *E. amylovora* und *E. coli* ähnlich sind.

Zusammenfassung

Das von *E. amylovora* in Saccharose-haltigen Medien produzierte Levan beruht auf der Syntheseleistung einer extrazellulären Levansucrase, die konstitutiv exprimiert wird. Das Enzym wurde als saures Protein mit einem Molekulargewicht von 46 kD charakterisiert. Der dafür kodierende chromosomale Genabschnitt konnte als 1,4 kb großes DNA-Fragment kloniert werden.

Transposon-Mutanten mit fehlender Levansucrase-Aktivität zeigen auf Birnensämlingen eine verzögerte Ausbreitung und verursachen eine verzögerte Entwicklung der Feuerbrand-Symptome. Der Levansucrase von *E. amylovora* kommt damit eine Rolle als Virulenzfaktor zu.

Literatur

- BENNET RA, BILLING E (1980). Origin of the polysaccharide component of ooze from plants infected with *Erwinia amylovora*. J. General Microbiol. 116:341-349.
- BERNHARD F, POETTER K, GEIDER K, COPLIN DL (1990). The rcsA gene from *Erwinia amylovora*, Identification, nucleotide sequence, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. Molecular Plant-Microbe Interactions 3:429-437.
- BEUTLER R (1930). Biologisch-chemische Untersuchungen am Nektar von Immenblumen. Zeitschr. Vergl. Phys. 12:72-176.
- COTE GL, IMAM SH (1989). Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. Carbohydr. Res. 190:299-307.
- DEDONDER R (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. Meth. Enzymol 8:500-505.
- GEIER G (1989). Charakterisierung extrazellulärer Polysaccharide des Feuerbrandreggers *Erwinia amylovora*. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- GROSS M, RUDOLPH K (1987). Studies on the extracellular polysaccharides (EPS) produced *in vitro* by *Pseudomonas phaseolicola*. Separation and characterization of the predominant EPS components levan, alginate and LPS. J. Phytopath. 119:206-215.
- GROSS M, GEIER G, GEIDER K, RUDOLPH K (1990). Levan and Levansucrase from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Proc. 7th Int. Conf. on Plant Pathogenic Bacteria; Academiai Kiado, Budapest, 81-84.
- KOLLAR A, SEEMÜLLER E (1990). Chemical composition of phloemexudate of mycoplasma-infected apple trees. J. Phytopath. 128:99-111.
- LOITSYANSKAYA MS, TKACHENKO AA, ELISASHVILI TA (1971). Levansucrase of *Acetobacter suboxydans*. Microbiol. USSR 40:439-442.
- LYNESS EW, DOELLE HW (1983). Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Letts. 5:345-350.
- MILLER TD, SCHROTH MN (1972). Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopath. 62:1175-1182.
- PABST MJ, CISAR JO, TRUMMEL CL (1979). The cell wall-associated levansucrase of *Actinomyces viscosus*. Biochim. et Biophys. Acta 566:274-282.
- WILSON M, SIGEE DC, EPTON HAS (1990). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom: III. The Nectary. J. Phytopath. 128:62-74.

K. Richter

Biologische Zentralanstalt Berlin
Institut für Phytopathologie Aschersleben

Feuerbrandresistenzprüfung bei Apfel- und Ziergehölzen

Einleitung

Zur Bekämpfung des Feuerbrandes sind gegenwärtig keine zugelassenen chemischen Pflanzenschutzmittel verfügbar. Der Anbau resistenter bzw. schwachanfälliger Obst- und Ziergehölze stellt damit die einzige Möglichkeit dar, die Krankheit wirksam einzudämmen. Aus der Sicht des Umweltschutzes ist dieses Verfahren darüber hinaus als optimal anzusehen.

Im Institut für Phytopathologie Aschersleben sind bereits im Jahre 1974 erste methodische Untersuchungen aufgenommen und vor allem Apfelsorten aus dem Weltsortiment hinsichtlich ihrer Feuerbrandresistenz untersucht worden.

In das Resistenzzuchtungsprogramm des Institutes für Obstforschung Dresden-Pillnitz wurde die Feuerbrandkrankheit 1977 als Zielgröße integriert. Die Testung des Zuchtmaterials erfolgt dabei weiterhin im Institut für Phytopathologie Aschersleben (IfP).

In diesem Beitrag soll besonders die Prüfmethode vorgestellt werden. Auf die Resultate der Feuerbrandresistenzzüchtung wird im Beitrag von Ch. FISCHER näher eingegangen.

Resistenzprüfmethoden

1. Pflanzenmaterial

Bei Apfel sind seit 1974 Sorten und später Zuchtstämme im Freiland und im Gewächshaus getestet worden. An einer Methodik für die Prüfung von Sämlingspopulationen wird gegenwärtig noch gearbeitet.

Birnensorten wurden bisher nur in geringer Zahl untersucht. Die Testung von weiteren Sorten und Zuchtstämmen hat begonnen. Untersuchungen an Ziergehölzen wurden seit 1984 vor allem an Cotoneaster, Amelanchier, Rosa, Malus, Pyracantha und Chaenomeles durchgeführt. Gegenwärtig werden Sorbus-, Crataegus-,

Chaenomeles- und Rosa-Arten geprüft.

2. Erreger

Die Verwendung hochvirulenten Pathogens für die Prüfungen ist eine entscheidende Voraussetzung, um dauerhafte Resistenzen zu finden.

1991 konnten alle 83 im IfP vorhandenen *Erwinia amylovora*-Stämme - darunter auch internationale Referenzstämme - hinsichtlich ihrer Virulenz untersucht werden. An Handveredlungen der Sorten 'Prima' und 'Malus Robusta Nr. 5' wurden im Gewächshaus je Stamm 5 bzw. 10 Triebe bei einer Länge von 7-15 cm inokuliert. Die Keimdichten der Bakteriensuspensionen wurden auf 10^9 Zellen/ml eingestellt. Die Auswertung erfolgte 4 Wochen p.i. nach folgender Formel:

$$\text{Befall (\%)} = \frac{\text{Nekrosenlänge (cm)}}{\text{Neuwuchslänge (cm)}} \cdot 100 \%$$

Da eine solche Virulenzanalyse sehr aufwendig ist, wurde zwischenzeitlich ein Virulenzscreening an Birnentriebstücken durchgeführt mit der Zielstellung, später eventuell die Zahl der Erregerstämme für die Virulenzanalyse zu reduzieren.

Je Sorte ('Alexander Lucas', 'Williams Christ', 'Konferenz') wurden dabei die Schnittstellen von 3 Triebstücken in die jeweilige Suspension (10^9 Zellen/ml) getaucht. Nach 2-5tägiger Lagerung der Triebe in einer Feuchtkammer im Labor erfolgte die Untersuchung der Schnittflächen hinsichtlich Schleimbildung.

Tabelle 1

Erwinia amylovora (Ea)-Stämme mit der höchsten Virulenz an der Apfelsorte 'Prima' im Vergleich zum Screening-Ergebnis bei Birnentreiben (n = 18 Schnittstellen).

Ea-Stamm	Apfel (%)	Birne (befallene Schnittstellen)
115	100	17
16	67,5	17
91	64,6	12 *
77	64,5	17
86	62,2	14
110	61,4	17
111	59,9	18
99	56,2	17
102	55,7	12 *
116	54,0	13

* n = 12

In der Tabelle 1 sind die E. amylovora-Stämme mit der höchsten Virulenz an der Apfelsorte 'Prima' im Vergleich zum Screening-Ergebnis bei Birne dargestellt. Da das Ziel besteht, 3 Stämme mit der höchsten Virulenz herauszufinden, wäre es nach diesen einjährigen Ergebnissen denkbar, erst ein Screening vorzunehmen und nur die Stämme in die Virulenzanalyse an Handveredlungen zu nehmen, die eine bestimmte Anzahl befallener Schnittstellen bewirkten. Es ist geplant, diese Untersuchungen fortzusetzen. An der Sorte 'Malus Robusta Nr. 5' verursachte nur der Stamm Ea 77 (= Stamm CUCPB 266 aus Kanada) nennenswerten Befall (82 %).

Für die Inokulationen an Handveredlungen (Apel) im Gewächshaus wurde 1991 in Anlehnung an NORELLI u. a. (1984) ein Gemisch aus 3 Stämmen (Ea 115, 91, 77) - Keimdichte jeweils 10^9 Zellen/ml - verwendet. Für die Untersuchungen im Freiland benutzten wir den Stamm 115.

3. Inokulationsmethoden

Triebinokulationen werden im IfP Aschersleben durch die von SCHAEFER u.a. (1975), in Anlehnung an BILLING (persönliche Mitteilung), entwickelte Methode vorgenommen. Dabei wird mit Hilfe einer Nähmaschinennadel eine entsprechend der Ohrgröße kalibrierte Inokulummenge in die Triebspitze bzw. in den Blattstiel des jüngsten sich entfaltenden Blattes inokuliert.

Blüteninfektionen sind nach unseren Erfahrungen besonders bei Birnen gefährlicher als Triebininfektionen.

Massiver Blütenbefall, nicht rechtzeitig erkannt, breitete sich bei Konferenzbirnen in der Regel bis in den Stammbereich aus. Aus diesem Grunde wurde in den letzten Jahren auch bei Apfelgehölzen die Blütenanfälligkeit mit erfaßt. Die Tabelle 2 zeigt einige Beispiele, die beweisen, daß es Sorten gibt, die eine höhere Triebanfälligkeit besitzen ('Gloster'), daß aber auch die Blütenanfälligkeit überwiegen kann.

Tabelle 2

Resistenzverhalten von Apfelsorten nach Trieb- und Blüteninfektion

Sorte	Triebininfektion im Gewächshaus	Anzahl befallener	
		<u>Blüten-</u> <u>büschel</u>	<u>Triebe</u>
		im Freiland (n=50) 1986	
Auralia	stark anfällig	31	11
Yellowspur	stark anfällig	6	-
Clivia	sehr schwach anfällig	10	-
Herma	schwach anfällig	1	6
Undine	stark anfällig	23	30
Juno	stark anfällig	12	11
Wealthy	stark anfällig	-	-
Starkrimson	resistent	2	-
Melba	resistent	-	-
Prima	resistent	-	-
James Grieve	stark anfällig	67	21
Gelber Köstlicher	stark anfällig	18	6
Gloster	stark anfällig	4	26

Nach unseren Erfahrungen ist es notwendig, beide Kriterien zur Einschätzung der Resistenz heranzuziehen. PAULIN (pers. Mitteilung) sieht dagegen unter französischen Bedingungen die Trieb-

anfälligkeit als das Primat an.

In den Laborversuchen prüften wir verschiedene Methoden zur Inokulation der Blüten (Tabelle 3).

Tabelle 3

Infektionserfolg nach unterschiedlicher Inokulation des Erregers in Birnenblüten (Anzahl befallener Blüten)

Inokulations- methode	Birne (n = 40)	
	'Konferenz'	'Alexander Lucas'
Betropfen	35	15
Einpinseln	36	20
Nadelstich	40	33
Schnitt	40	39

Blüten wurden betropft bzw. mit erregersuspension eingepinselt; Blütenstiele mit einer Nadel (s.o.) angestochen. Als vierte Variante wurde die Blüte entfernt und auf die Schnittfläche Suspension getropft.

Bei den Konferenzbirnen konnten in allen Varianten hohe Infektionszahlen erreicht werden, wogegen bei 'Alexander Lucas' das Betropfen und Einpinseln der Blüten weniger erfolgreich waren. Der Vergleich mit den beiden anderen Varianten läßt die Vermutung zu, daß es sich hier um eine Eindringungsresistenz handelt.

Im Rahmen der Resistenzprüfungen im Freiland wurden die Blüten durch Einpinseln inokuliert. Da hierbei keine Abdrift von Erregersuspension auftreten kann, ist es möglich, gleichzeitig eine natürliche Ausbreitung des Befalles im Gehölz zu erfassen.

4. Versuchsauswertung

Zur Auswertung der Triebanfälligkeit wurde die aus der Tabelle 4 zu ersiehende neue Bewertungsskala verwendet.

Tabelle 4

Bewertungsskala für Triebinfektionen bei Feuerbrand am Apfel

Einteilung der Befallslänge in % nach Boniturnoten (Wertzahlen)

9 ... 1

(erarbeitet von C. Fischer, IfO Pillnitz, nach MOLL, Kleinmachnow)

% Befallslänge (neue Einteilung)	Boniturnote	% Befallslänge (alte Einteilung)
0 - 0,9	9	0 - 4,8
1,0 - 16,3	8	4,9 - 10,6
16,4 - 31,0	7	10,7 - 17,5
31,1 - 44,2	6	17,6 - 25,8
44,3 - 56,1	5	25,9 - 35,8
56,2 - 66,9	4	35,9 - 47,8
67,0 - 76,5	3	47,9 - 62,2
76,6 - 85,2	2	62,3 - 79,4
85,3 - 100	1	79,5 - 100

Der Vorteil dieser im Vergleich zur älteren Einteilung besteht darin, daß der Boniturnote 5 wirklich ein mittlerer Befall gegenübersteht. Außerdem ist der zulässige Befall in der Boniturstufe 9 kleiner gewählt.

Literatur

NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S.; BEER, S.V.: Differential host x pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 74 (1984), 136-139.

SCHAEFER, H.-J.; BEYME, D.; FICKE, W.; KLEINHEMPEL, H.: Eine Infektionsmethode zur Anfälligkeitsprüfung von Apfel- und Birnensorten gegen *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. unter Gewächshausbedingungen. *Arch Phytopathol. u. Pflanzenschutz*, Berlin 11 (1975), 161-163.

W. Zeller

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, 6915 Dossenheim

Untersuchungen zur Resistenz von Apfel- und Birnensorten gegen
den Feuerbrand (*Erwinia amylovora*)

Unmittelbar nach der Einschleppung des Feuerbrandes auf Schleswig-Holsteinisches Gebiet wurden ab 1974 von der Biologischen Bundesanstalt in Zusammenarbeit mit dem Pflanzenschutzdienst drei Versuchsanlagen im Befallsgebiet errichtet, um hier mit ersten Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Krankheit, in erster Linie aber der Resistenzprüfung des einheimischen Kernobst- und Ziergehölzsortiments gegen den Erreger zu beginnen (ZELLER und MEYER 1975). Später nach der weiteren Ausbreitung auf süddeutsche Regionen wurde dann auch dort im Jahre 1985 eine Versuchsanlage in Kooperation mit dem Baden-Württembergischen Pflanzenschutzdienst errichtet, um unter den Bedingungen in Süddeutschland weitere Untersuchungen durchzuführen, u.a. auch eine Resistenzprüfung an dortigen Lokalsorten, aber auch an den im Obstbau üblichen Birnen- und Apfelsorten. Es stellte sich insbesondere die Frage, ob die unterschiedlichen epidemiologischen Bedingungen von Nord- und Süddeutschland einen Einfluß auf die Resistenz bzw. Anfälligkeitsreaktion des Sortiments ausüben.

Methodik

In Norddeutschland wurden 1974 zunächst 25 Kernobstsorten ausgepflanzt, 1979 ein weiteres Sortiment von 35 Sorten (ZELLER 1983). In Süddeutschland erfolgte 1986 die Auspflanzung von insgesamt 75 Apfel- und Birnensorten. Die Testung wurde jeweils nach künstlicher Infektion durchgeführt; mit einer Injektionsspritze wurden 3-5 sukkulente Triebe eines jeden Baumes mit etwa 0.2 ml einer Bakteriensuspension von ca. 10^8 Zellen/ml in die Triebspitze an 3 Stellen infiltriert. Als Bakterienstamm wurde jeweils ein Isolat von *Cotoneaster bullatus* verwendet. Einzelheiten der Anzucht und Inokulation wurden zuvor beschrieben (ZELLER und MEYER 1975). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Boniturschemas von

1 (schwächster Befall) bis 5 (abgestorbener Baum). Eine Pflanze ohne Symptome wurde mit 0 bewertet. Die Befallswerte in den Tabellen beziehen sich jeweils auf die im September erfolgte Bonitur, da zu diesem Zeitpunkt der stärkste Befallsgrad festzustellen war.

Ergebnisse und Diskussion

Die Anfälligkeit der Birnensorten war in allen 3 wegen der starken Symptomentwicklung als repräsentativ ausgewählten Befallsjahren deutlich höher als die der Apfelsorten, z.B. waren von den als besonders hochanfällig eingestuften Birnensorten teilweise eine hohe Anzahl von Bäumen innerhalb der Vegetationsperiode total abgestorben. Überraschend war unter süddeutschen Verhältnissen der Anteil an ausgefallenen Bäumen niedriger und auch der durchschnittliche Befallsgrad geringer (Tab.1). Wie in Norddeutschland zeigten jedoch auch hier die Sorten 'Trevoux', 'Gräfin von Paris', 'Vereinsdechant', aber auch 'Winterforelle' ein hochanfälliges Verhalten. Einen mittleren Anfälligkeitsgrad mit teils starker wie auch schwacher Symptombildung wiesen jeweils 'Williams', 'Conference', 'Clapps', 'Gute Luise' und 'Charneux' auf. Letzteres deutet auf ein nicht klar abzugrenzendes Verhalten dieser Sorten hin und entspricht auch Befunden von amerikanischen Autoren (OITTO et al. 1979, QUAMME 1977). Als hochresistent war insgesamt 'Alexander Lucas' einzustufen, was auch mit zuletzt durchgeführten Untersuchungen in Südfrankreich übereinstimmt (THIBAULT and LEZEC 1990). Eine Ausnahme bildete 'Gellerts', die allgemein als resistent bewertet wird, jedoch in Süddeutschland eine mittlere Anfälligkeit zeigte.

Bei den Apfelsorten zeigte sich, wie schon angedeutet, eine deutlich geringere Anfälligkeit, z.B. war über den gesamten Zeitraum der Prüfung kein einziger Baum vollständig abgestorben. Zu den stärker anfälligen Sorten gehörten in Norddeutschland 'James Grieve', 'Goldparmäne', 'Jonathan', 'Gloster', 'Idared', 'Klarapfel' und 'Oldenburg'. Obwohl bei der letzteren Sorte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Testjahren 1977 und 1981 vorlag, war die Infektionsrate jedoch in beiden Jahren 100 %. Zu den resistenten Apfelsorten waren neben den 'Golden'-Abkömmlingen 'Jonagold' und 'Ingol' noch die beiden 'Boskoop'-Sorten sowie 'Ontario' und 'Jamba' zu rechnen. Zu ähnlichen Er-

gebnissen führte die Testung in Süddeutschland. Insgesamt war hier der Befallsdruck niedriger, was sich auch in der geringeren Infektionsrate widerspiegelt. Außerdem dürfte die bei allen Apfelsorten verwendete Unterlage M 9 zusätzlich einen negativen Einfluß auf die Infektion ausgeübt haben, zumal diese Apfelunterlage als nur schwach anfällig gilt (BILLING 1978, van der ZWET und KEIL 1979). Es zeigte sich aber auch hier, daß z.B. 'James Grieve' sowie 'Idared', 'Klarapfel', 'Jonathan', 'Oldenburg' und 'Goldparmäne' unter den mehr anfälligen Sorten einzureihen waren, während z.B. die 'Golden'-Abkömmlinge sowie 'Boskoop', 'Ontario' und 'Jamba' wiederum zu den resistenten Sorten gehörten. Dies steht auch weitgehend in Übereinstimmung mit französischen Autoren, die ein größeres Sortiment von Apfel- und Birnensorten in der stark befallenen Region von Bordeaux auf Feuerbrandresistenz getesteteten (THIBAUT and Lezec 1990).

Aus diesen ersten Befunden in Süddeutschland läßt sich ein weitgehend ähnliches Verhalten der Birnen- und Apfelsorten gegenüber dem Feuerbrand-Erreger ableiten, wenn auch kleinere Abweichungen, wie z.B. bei 'Gellerts', vorhanden sind. Dies könnte jedoch an unterschiedlichen phänologischen Bedingungen in den Versuchsjahren liegen. Weitere Untersuchungen müssen diese ersten Befunde noch weiter erhärten.

Literatur

- BILLING, E., 1978: Fireblight susceptibility of apple rootstocks an examination of test methods. Acta Hort. 86, 39-40
- OITTO, W. A., ZWET, T. van der and BROOKS, H.J., 1970: Rating of pear cultivars for resistance to fireblight. Hort. Sci. 5, 474-476
- QUAMME, H.A., 1977: Resistance to naturally and artificially induced fireblight in the Harrow pear collection. Can.Pl.Dis. Survey 57, 9-12
- THIBAUT, B. and LEZEK, M.L., 1990: Sensibilite au Feu Bacterien des principales varieties de pommier et de poirier utilises en europe. Commision Europ. Comm.,Agric.EUR 12601, 96-109
- ZELLER, W. und MEYER, J., 1975: Untersuchungen zur Feuerbrandkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. 1. Krank-

heitsverlauf von Obst- und Ziergehölzen nach natürlichem Befall und künstlicher Inokulation. Nachrichtenbl.Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 27, 161-169

ZELLER, W., 1983: Resistenzprüfung von Apfel- und Birnensorten gegen den Feuerbrand. Obstbau 8, 266-268

ZWET, T. van der and KEIL, H., 1979: Fireblight, a bacterial disease of Rosaceous plants. USDA Agricultural Handbook Nr. 510

Tab.1 Feuerbrand-Anfälligkeit von Birnensorten nach künstlicher Infektion

a. 1977 Norddeutschland

Sorten	Anzahl Bäume	% infiziert	tot	Befallsgrad ø
Trevoux	4	100	4	5.0
Bunte Juli	3	100	2	4.7
Vereinsdechant	4	100	1	3.8
Gräfin v.Paris	3	67	2	3.3
Gute Luise	12	100	1	2.8
Williams	25	100	-	2.5
Charneux	11	100	-	2.5
Conference	12	100	4	2.5
Clapps	13	100	3	2.6
Gellerts	12	50	-	0.9
Alexander Lukas	4	0	-	-

b. 1981 Norddeutschland

Lectier	5	100	2	4.4
Trevoux	4	100	2	4.1
Geisshirtle	5	100	1	2.6
Gelbmöstler	5	60	-	2.4
Conference	11	91	3	1.7
Clapps	10	80	1	1.7
Williams	47	67	5	1.5
Charneux	7	100	1	1.3

Gräfin v.Paris	8	100	1	1.3	
Beurre Bosc	4	50	-	1.2	
Theillers	5	100	-	1.1	
Gute Luise	10	80	-	0.8	
Schw. Wasserbirne	5	60	-	0.4	
Gellerts	5	60	-	0.3	
Alexander Lukas	8	62	-	0.1	

	<i>c. 1989 Süddeutschland</i>				
Winterforelle	5	100	3	3.0	
Trevoux	5	88	-	3.0	
Pastorenbirne	10	96	-	2.9	
Herzogin Elsa	10	88	2	2.7	
Gräfin v.Paris	9	62	-	2.4	
Vereinsdechant	7	97	-	2.4	
Bristol Cross	7	83	-	2.4	
Tongern	6	100	-	2.0	
Clapps	8	47	-	1.5	
Gellerts	9	49	-	1.5	
Conference	6	77	-	1.3	
Williams	10	80	-	1.2	
Beurre Bosc	6	3	-	1.2	
Packhams	10	98	-	1.2	
Grand Champion	4	55	-	1.2	
General Leclerc	7	80	-	1.1	
Gute Luise	6	28	-	1.0	
Pierre Corneille	8	62	-	0.8	
Charneux	10	24	-	0.8	
Giffards	9	4	-	0.1	
Alexander Lukas	10	0	-	-	

Tab. 2 Feuerbrand-Anfälligkeit von Apfelsorten nach künstlicher Infektion

a. 1977 Norddeutschland

Sorten	Anzahl Bäume	% infiziert	Befallsgrad ø
James Grieve	5	100	2.6
Goldparmäne	22	100	2.5
Jonathan	22	100	2.3
Gloster	4	100	2.3
Berlepsch	19	74	2.1
Klarapfel	23	96	1.8
Oldenburg	5	100	1.4
Cox Orange	19	89	1.1
Ingrid Marie	6	67	1.0
Gravensteiner	5	80	0.8
Martini	3	67	0.7
Finkenwerder	3	33	0.3
Golden Delicious	23	26	0.3
Ontario	7	14	0.1

b. 1981 Norddeutschland

Oldenburg	6	100	3.1
Champ. Renette	9	100	3.0
Goldparmäne	5	100	2.6
James Grieve	4	100	2.3
Jonathan	9	100	2.1
Idared	9	100	1.9
Granny Smith	5	100	1.7
Laxtons Superb	7	100	1.2
Mantet	10	90	1.0
Stark Earliest	5	100	0.8
Glockenapfel	20	95	0.7
Roter Boskoop	5	100	0.6
Melrose	10	100	0.6
Boskoop	8	100	0.5

Alkmene	5	80	0.4	
Golden Delicious	15	53	0.2	
Herbstprinz	5	80	0.2	
Jonagold	8	75	0.2	
Ingol	7	57	0.1	
Jamba	3	-	-	

c. 1989 Süddeutschland

Ingrid Marie	8	67	2.2	
James Grieve	9	71	2.1	
Bittenfelder	10	72	1.8	
Malling Kent	9	60	1.7	
Elstar	8	52	1.7	
Champ.Renette	8	5	1.6	
Idared	9	49	1.6	
Zabergäu	8	40	1.6	
Klarapfel	8	60	1.5	
Engelsberger	8	57	1.5	
Jonathan	8	70	1.5	
Oldenburg	7	60	1.5	
Cox Orange	8	52	1.4	
Goldparmäne	8	62	1.3	
Karmijn d.Sonnav.	5	56	1.2	
Gelber Rambour	7	77	1.1	
Berlepsch	8	47	1.0	
Granny Smith	6	70	1.0	
Akane	7	65	1.0	
Hauxapfel	7	40	1.0	
Kardinal Bea	13	31	0.7	
Melrose	8	17	0.7	
Alkmene	10	12	0.6	
Sir Prize	8	5	0.5	
Altl.Pfannkuchen	5	8	0.4	
Gloster	11	20	0.4	
Glockenapfel	7	17	0.4	
Astramel	7	8	0.4	

Brettacher	9	20	0.3	
Discovery	8	10	0.2	
Jamba	10	6	0.2	
Mutsu	10	6	0.1	
Horneburger	9	4	0.2	
Ingol	8	10	0.2	
Ontario	8	2	0.1	
Finkenwerder	8	2	0.1	
Boskoop	10	2	0.1	
Gravensteiner	9	2	0.1	
Schw.Orangenapfel	8	5	0.1	
Maunzen	9	2	0.1	
Bohnapfel	8	-	-	
Golden Delicious	10	-	-	
McIntosh	10	-	-	
Jonagold	10	-	-	
Vista Bella	8	-	-	
Gala	9	-	-	
Charden	9	-	-	

Christa Fischer

Institut für Obstforschung Dresden-Pillnitz

Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegenüber Feuerbrand an Apfel

Das Ziel einer effizienten Resistenzzüchtung beim Apfel ist auf eine ökologisch und biologisch wirksame Verminderung von chemischen Pflanzenschutzmaßnahmen gerichtet. Das erfordert die Erhöhung des Resistenzgrades gegenüber wirtschaftlich bedeutenden Schaderegern, insbesondere Feuerbrand, aber auch Schorf und Mehltau. Im mitteleuropäischen Raum hat der natürliche Befallsdruck mit Feuerbrand so stark zugenommen, daß bei den Obstarten Apfel, Birne und Quitte starke Schädigungen durch Ertrags- und Baumausfälle eintreten und die Bestandessicherheit der Obstanlagen stark gefährden. Wirksame Bakterizide, die sowohl aus humanmedizinischen Gründen als auch für den integrierten Obstanbau vertretbar sind, fehlen. Die auf Dauer wirksamste Bekämpfungsmöglichkeit des Feuerbrandes ist der Anbau resistenter Sorten.

Unsere Arbeiten zur Feuerbrandresistenz begannen mit dem spontanen Erstauftreten des Feuerbrandes in der DDR 1972 mit phytopathologischen Arbeiten im Institut für Phytopathologie Aschersleben. Gemeinsam mit dem Institut für Obstforschung Dresden-Pillnitz wurden ab 1974 umfangreiche Resistenzprüfungen an Kultursortimenten und Pillnitzer Zuchtmaterial vorgenommen. Mit dem Auffinden von Resistenzdonoren gegen Feuerbrand beim Apfel in dem umfangreichen Pillnitzer Zuchtmaterial wurden seit 1977 systematische Züchtungsarbeiten mit Einkreuzung der Feuerbrandresistenz durchgeführt (Abb.1). Dem Ziel der Kombination von Mehrfachresistenz mit hohen obstbaulichen Qualitätseigenschaften in der Resistenzzüchtung beim Apfel ordnen sich damit auch die Arbeiten zur Feuerbrandresistenzzüchtung ein.

Material und Methoden

Im Untersuchungszeitraum von 1974 bis 1991 wurde ein umfangreiches Material aus dem Genfond von Apfel (300 Idiotypen), von Birne (33) sowie Wildarten (9), von Apfelsorten-Zuchtmaterial (ca. 5000 Hybriden) sowie von Apfelunterlagen- (53) und Birnenunterlagen-Zuchtmaterial (96) getestet.

Die Resistenzprüfung erfolgte in Form der Triebinfektion von veredelten Pflanzen im Gewächshaus mit einem Stichprobenumfang von 50 Pflanzen je Sorte bzw. Hybride. Mit Hilfe der Nadelstich-Inokulation wird Bakteriensuspension in den wachsenden grünen Trieb injiziert. Die Konzentration beträgt 1×10^9 Bakterien je ml. Zur Ermittlung des Resistenzgrades wird die Trieblänge vor der Inokulation sowie die Befallslänge gemessen. Die Befallslänge wird einem 9stufigen Boniturschema zugeordnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe der Varianzanalyse mit der Signifikanzgrenze von $p = 0.05$. Für die Resis-

tenzprüfungen wurden verschiedene Stämme von *Erwinia amylovora* nach vorhergehender Analyse ihrer Virulenz verwendet.

Als Züchtungsmethode wird für die Kombination der verschiedenen Resistenz- und Qualitätsmerkmale die Kombinationszüchtung genutzt. Die verschiedenen Merkmale werden nach Art der Konvergenzzüchtung kombiniert. Vererbungsanalysen von verschiedenen Autoren (MOORE 1946, FISCHER et al. 1983, LESPINASSE and PAULIN 1990) lassen eine polygen bedingte Feuerbrandresistenz vermuten, die durch eine hohe Variabilität charakterisiert ist (VAN DER ZWET et al. 1974).

Ergebnisse und Diskussion

In unserer Resistenzprüfung wurden im Kultursortiment keine Resistenzdonoren gefunden. Die Sommer- und Herbstsorten, besonders 'James Grieve', sind alle stark anfällig, aber auch Wintersorten, wie 'Auralia', 'Gloster' und 'Idared'. Gering anfällig sind die Pillnitzer Neuzüchtungen 'Pinova' und 'Pilot' (FISCHER und SCHAEFER 1990).

Die Nutzung genetischer Ressourcen ist für die Einkreuzung der Feuerbrandresistenz der sicherste und effizienteste Weg, um das Resistenzniveau in neuen Apfelsorten zu erhöhen. Resistenzdonoren wurden aus dem Wildsortiment ermittelt, so *Malus robusta*, *M. sublobata*, *M. atrosanguinea*, *M. prunifolia*, *M. fusca* (ALDWINCKLE and VAN DER ZWET 1979). 'Novole' als F_1 -Hybride von *M. prunifolia* ist Feuerbrand-resistent (CUMMINS and ALDWINCKLE 1983). Auch in der Wildart *M. floribunda* werden Resistenzgene vermutet (NORELLI et al. 1986, FISCHER et al. 1983). In unseren Untersuchungen konnte eine hohe Feuerbrandresistenz in Nachkommenschaften von *M. floribunda* im Vergleich zu Nachkommenschaften verschiedener Kultursorten (FISCHER et al. 1983) ermittelt werden (Abb. 2). Aus den Nachkommenschaften mit Kultursorten wurde bisher eine Hybride mit Feuerbrandresistenz gefunden. Sie stammt aus der Kreuzung von 2 stark anfälligen Elternsorten. Verschiedene resistente Idiotypen wurden in systematischen Kreuzungsplänen auf ihre Kombinationseignung und Vererbung geprüft. Aus einem vollständigen Diallel mit 5 Elternsorten, davon 'Idared' als Feuerbrand-anfälliger Sorte und 4 Feuerbrand-resistenten Sorten ergab sich ein Anteil von Feuerbrand-resistenten Sämlingen in den Populationen von 12 bis 53 %. Der Anteil Feuerbrand-resistenter Sämlinge variierte in den Nachkommenschaften "anfällig x resistent" zwischen 12 und 25 %, in Nachkommenschaften "resistent x resistent" zwischen 26 und 53 %.

Bei Betrachtung der züchterischen Zielstellung auf Dreifachresistenz gegen Schorf, Mehltau und Feuerbrand wurde mit den Elternsorten, die selbst Dreifachresistenz besitzen, eine hohe geschätzte Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. Damit kann durch gezielte Elternwahl eine wesentlich höhere Selektionsrate erreicht werden (Abb. 3).

Mit Hilfe von Schätzwerten der allgemeinen Kombinationseignung (gca) kann die Vererbung nachgewiesen werden. Für Feuerbrandresistenz wurde eine Elternsorte, BX 44, 14,

mit einem hohen gca-Wert ermittelt, die Feuerbrandresistenz vererbt. Die hochanfällige Elternsorte 'Idared' ergab einen sehr niedrigen gca-Wert und vererbt ihre hohe Anfälligkeit (Tab.1)

Die bisher dargelegten Ergebnisse betreffen das Resistenzverhalten von Apfel-Idiotypen nach Triebinfektionen. Untersuchungen zur Blüteninfektion von SCHAEFER (1986) ergaben deutliche Befallsunterschiede zwischen Trieb- und Blüteninfektion. Daraufhin wurden von SCHAEFER gezielte Untersuchungen auf Blüteninfektion durchgeführt. Bei einer Reihe von Idiotypen konnten keine Korrelationen zwischen Trieb- und Blütenbefall nachgewiesen werden. Sowohl Apfelsorten als auch Zuchtstämme wiesen signifikante Unterschiede im Trieb- und Blütenbefall auf, u.a. die Sorten 'Alkmene', 'Auralia', 'Jonagold', 'Red McIntosh' sowie die Zuchtstämme Pi-AS-175 und Pi-AS-176, andere dagegen zeigten Übereinstimmung im Trieb- und Blütenbefall, u.a. 'Helios', 'Piros', 'James Grieve', 'Breuhahn', 'Jonathan', 'Undine', 'Gloster'. Für einen hohen Resistenzgrad stimmen die Ergebnisse der Trieb- und Blüteninfektion bei den Zuchtstämmen Pi-A-9, Pi-AS-173, Pi-AS-174 und Pi-AS-180 überein (Tab.2). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, für die sichere Bestimmung des Resistenzgrades einer Sorte sowohl auf Trieb- als auch auf Blüteninfektion zu testen (FISCHER und SCHAEFER 1990).

Ziel unserer Züchtungsarbeiten ist die Mehrfachresistenz gegen Schaderreger mit hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Die Kombination verschiedener Resistenzen, die im Institut Pillnitz züchterisch bearbeitet werden, zeigt Tab. 3. Eine hohe Effizienz wird im Anbau mit dreifachresistenten Sorten erreicht, die gegen Schorf, Mehltau und Feuerbrand resistent sind. In 10-jährigen Anbauexperimenten wurde nachgewiesen, daß ohne jede Fungizidbehandlung von der Pflanzung an über die gesamte Standzeit bei resistenten Sorten keine Belastung mit Schorf, Mehltau sowie anderen Pilzkrankheiten aufgetreten ist. Mit solchen mehrfachresistenten Sorten wie 'Remo', 'Reanda', 'Rewena' und 'Reglindis' läßt sich ein integrierter Apfelanbau wesentlich sicherer handhaben.

Für den Anbauer sind in jedem Falle solche Eigenschaften wie Geschmack, Reifezeiten und Ertragsfähigkeit, die den Marktwert einer Sorte bestimmen, von großer Bedeutung. Das resistente Apfelsortiment aus der Züchtung von Pillnitz, das sich derzeit in verschiedenen Lehr- und Versuchsanstalten Deutschlands in Prüfung befindet, beinhaltet die unterschiedlichsten Merkmalskombinationen mit hohem Marktwert (Tab. 4). Hohe Geschmacks- und Ertragseigenschaften, das Angebot von resistenten Sorten in allen Reifegruppen und Mehrfachresistenz bieten die Gewähr, solche Sortimente integriert bzw. biologisch anzubauen. Damit leistet die Resistenzzüchtung einen wesentlichen Beitrag für die Reduzierung der Produktionkosten und gleichzeitig für die Verminderung der Umweltbelastung.

Zusammenfassung

Die Züchtung auf Feuerbrandresistenz wird als ein Resistenzfaktor gleichzeitig mit Schorf- und Mehlttauresistenz im Apfel-Resistenzzüchtungsprogramm des Instituts für Obstforschung Dresden-Pillnitz bearbeitet. In Resistenzprüfungen wurden gemeinsam mit dem Institut für Phytopathologie Aschersleben Resistenzdonoren beim Apfel gefunden, die Feuerbrandresistenz vererben. Durch gezielte Elternwahl läßt sich in Kreuzungsnachkommenchaften die Selektionsrate auf Feuerbrandresistenz sowie auf Dreifachresistenz gegen Schorf, Mehltau und Feuerbrand wesentlich erhöhen. Zur sicheren Beurteilung der Feuerbrandresistenz von Idiotypen sind unter unseren klimatischen Bedingungen Trieb- und Blüteninfektionen erforderlich. Die in Prüfungen befindlichen resistenten Apfelsorten können mit ihrem Marktwert für den integrierten bzw. biologischen Apfelanbau angeboten werden.

Literatur

- ALDWINCKLE, H.S. and VAN DER ZWET, T.: Recent progress in breeding for fire blight resistance in apples and pears in North America. *EPPO Bull.* 9 (1) (1979), S.27-34
- CUMMINS, J.N. and ALDWINCKLE, H.S.: Novole apple. *Hort.Sci.* 18, (1983), 5, S. 772-774
- FISCHER, C., FISCHER, M., SCHAEFER, H.-J. und FICKE, W.: Erste Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegen Feuerbrand, *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. bei Kernobst. Tagungsberichte der AdL 216, (1983), S. 499-507
- FISCHER, C. und SCHAEFER, H.-J.: Vergleichende Untersuchungen der Resistenz von Apfelsorten gegenüber Feuerbrand im Gewächshaus und im Freiland. *Gartenbau* 37, (1990), S. 299-300
- LESPINASSE, Y. and PAULIN, J.P.: Apple breeding programme for fire blight resistance: strategy used and first results. *Acta Horticulturae* 273, (1990), S. 285-295
- MOORE, R.C.: Inheritance of fire blight resistance in progenies of crosses between several apple varieties. *Proc.Amer.Soc.Hort.Sci.* 47, (1946), S. 49-57
- NORELLI, J.L., ALDWINCKLE, H.S. and BEER, S.V.: Differential susceptibility of *Malus* spp. cultivars Robusta 5, Novole and Ottawa 523, to *Erwinia amylovora*. *Plant Disease* 70, (1986), S. 1017-1019
- RICHTER, K.: Mündliche Mitteilungen. 1991
- SCHAEFER, H.-J.: Ergebnisse von Blüteninfektionen mit Feuerbrand beim Apfel. Unveröffentlicht. 1986
- VAN DER ZWET, T., OITTO, W.A., and WESTWOOD, M.N.: Variability in degree of fire blight resistance within and between *Pyrus* species, interspecific hybrids, and seedling progenies. *Euphytica, Wageningen* 23, (1974), S. 259-304

Tab. 1 Schätzwerte der allgemeinen Kombinationseignungen von 5 Kreuzungseltern
Merkmal: Feuerbrandbefall 1987 (n.s. = nicht signifikant)

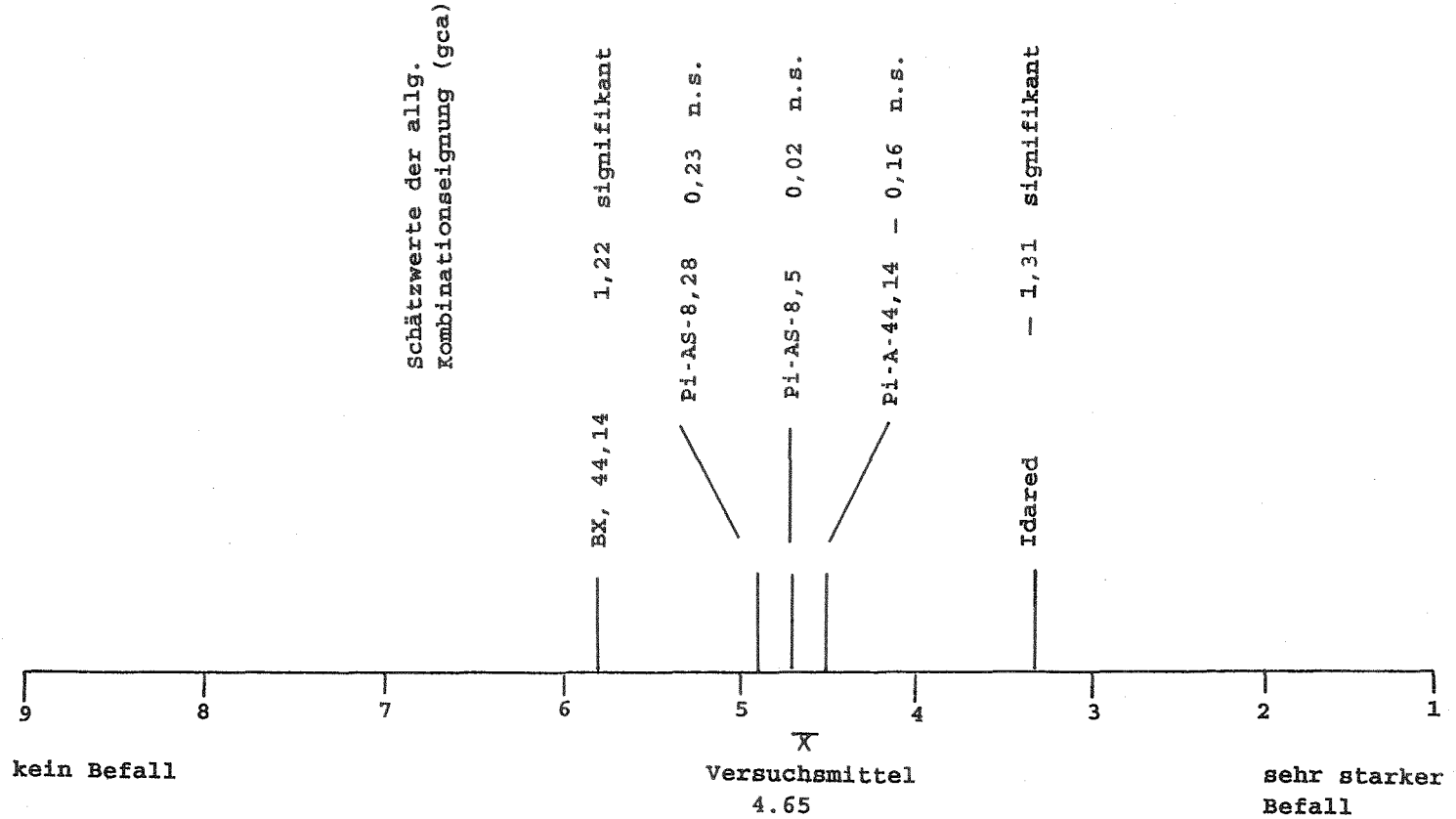


Tabelle 2

Resistenzverhalten von Apfelsorten und Zuchtstämmen gegenüber Feuerbrand. (1) künstlicher Test Triebinfektion Gewächshaus 1980 bis 1988, (2) künstliche Triebinfektion und (3) künstliche Blüteninfektion im Freiland 1986 und 1988, (4) natürlicher Befall 1985. (Bonitur 9 - ohne Befall)
(nach FISCHER und SCHAEFER, 1990)

Sorte/ Zuchtstamm	(1)		(2)		(3)		(4)	
	Bonitur	Befall	Befall	Befall	Bonitur	Befall	Bonitur	Befall
		verbal	%	%		verbal		verbal
	Gewächshaus		Freiland		Freiland		Freiland	
Alkmene	5,9	m	1	53	7,0	schw		
Auralia	4,7	m	20	81	4,0	m - st		
Jonagold	2,7	st	6	37	5,0	m		
Red McIntosh	1,3	s.st	8	30	5,0	m		
Pi-AS-175	8,6	res.	0	23	9	ohne		
Pi-AS-176	7,2	schw	1	41	9	ohne		
Helios	4,0	m - st	31	55	9	ohne		
Piros	4,0	m - st	42	97	4,0	m - st		
James Grieve	4,0	m - st	77	100	1,0	s.st		
Breuhahn	5,3	m	29	44	5,0	m		
Jonathan	5,1	m	32	57	5,0	m		
Undine	3,8	st	37	73	n.u.			
Gloster	3,4	st	33	31	5,0	m		
Pi-A-9	8,6	res.	0	1	9	ohne		
Pi-AS-173	8,0	res.	1	3	8,5	res.		
Pi-AS-174	8,5	res.	0	2	9	ohne		
Pi-AS-180	8,5	res.	0	2	9	ohne		

Anmerkung: schw - schwach, m - mittel, st - stark,
s.st - sehr stark, res. - resistent

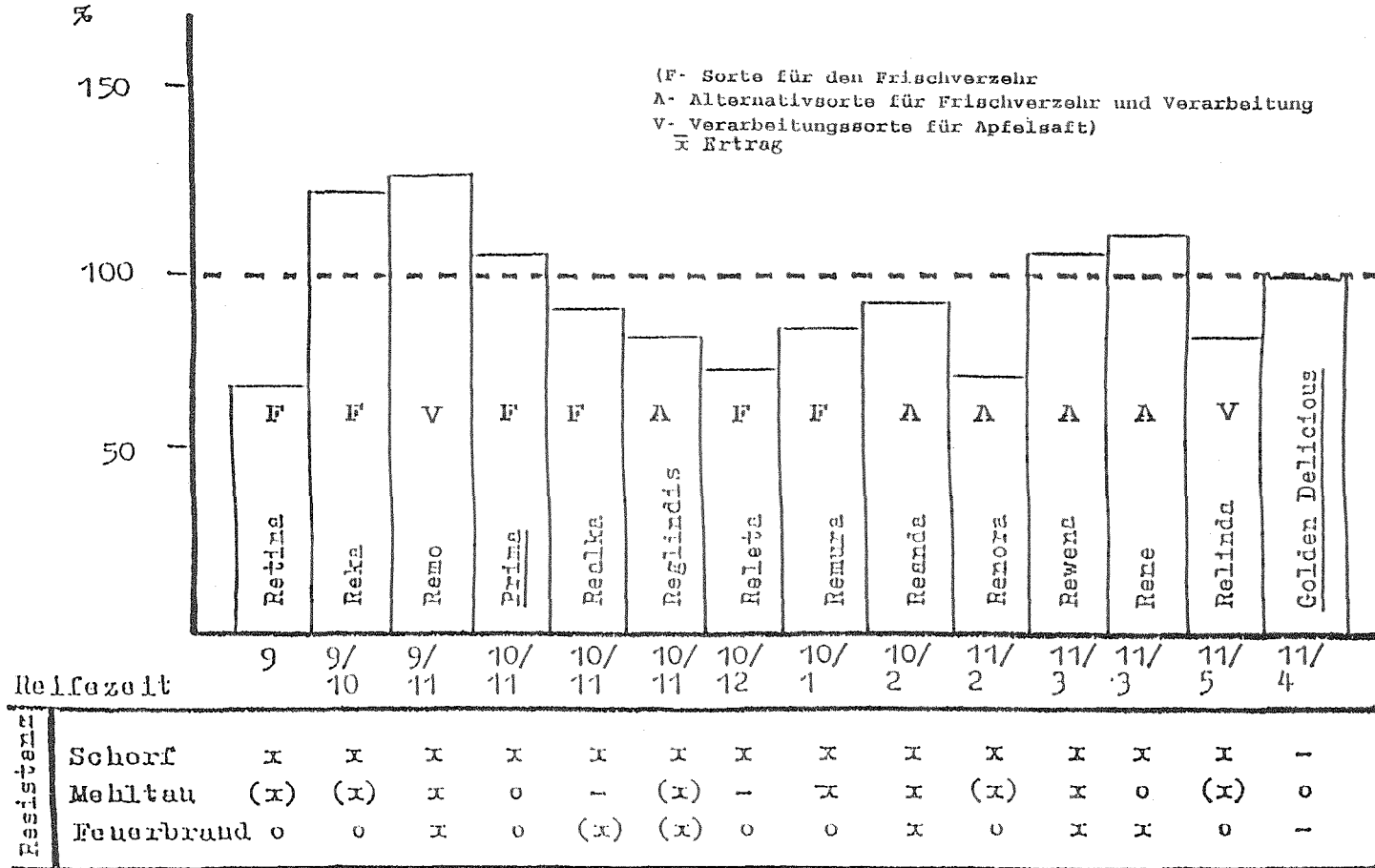
Tabelle 3

Resistenzigenschaften von resistenten Apfelsorten aus der Züchtung des Instituts für
Obstforschung Dresden-Pillnitz (FISCHER 1989).

(Legende: x resistent, Frostverträglichkeit hoch
(x) schwach resistent
o mittel anfällig
- stark anfällig)

Sorte	Schorf	Mehltau	Feuerbrand	Bakterien- brand	Obstbaum- spinnmilbe	Winter- frost	Blüten- frost
Remo	x	x	x	o	o	x	x
Reglindis	x	(x)	(x)	o	x	x	
Retina	x	(x)	o	o	(x)	-	x
Reka	x	(x)	o	x	-	(x)	-
Remura	x	x	o	o		x	o
Reanda	x	x	x	o	-	o	x
Renora	x	(x)	o	o	o	(x)	x
Rewena	x	x	x	x	o	o	x
Rene	x	o	x	(x)	-	o	x
Relinda	x	(x)	o	x	-		

Tab. 4 Ertrag, Reifezeit und Resistenzeigenschaften von Apfel-Neuzüchtungen des Instituts für Obstforschung Dresden-Pillnitz im Vergleich mit 'Prima' und 'Golden Delicious', Mittelwert von 7 Jahren, 6 Standorten, 3 Unterlagen, resistente Neuzüchtungen ohne Fungizidbehandlungen (FISCHER, C. 1989)



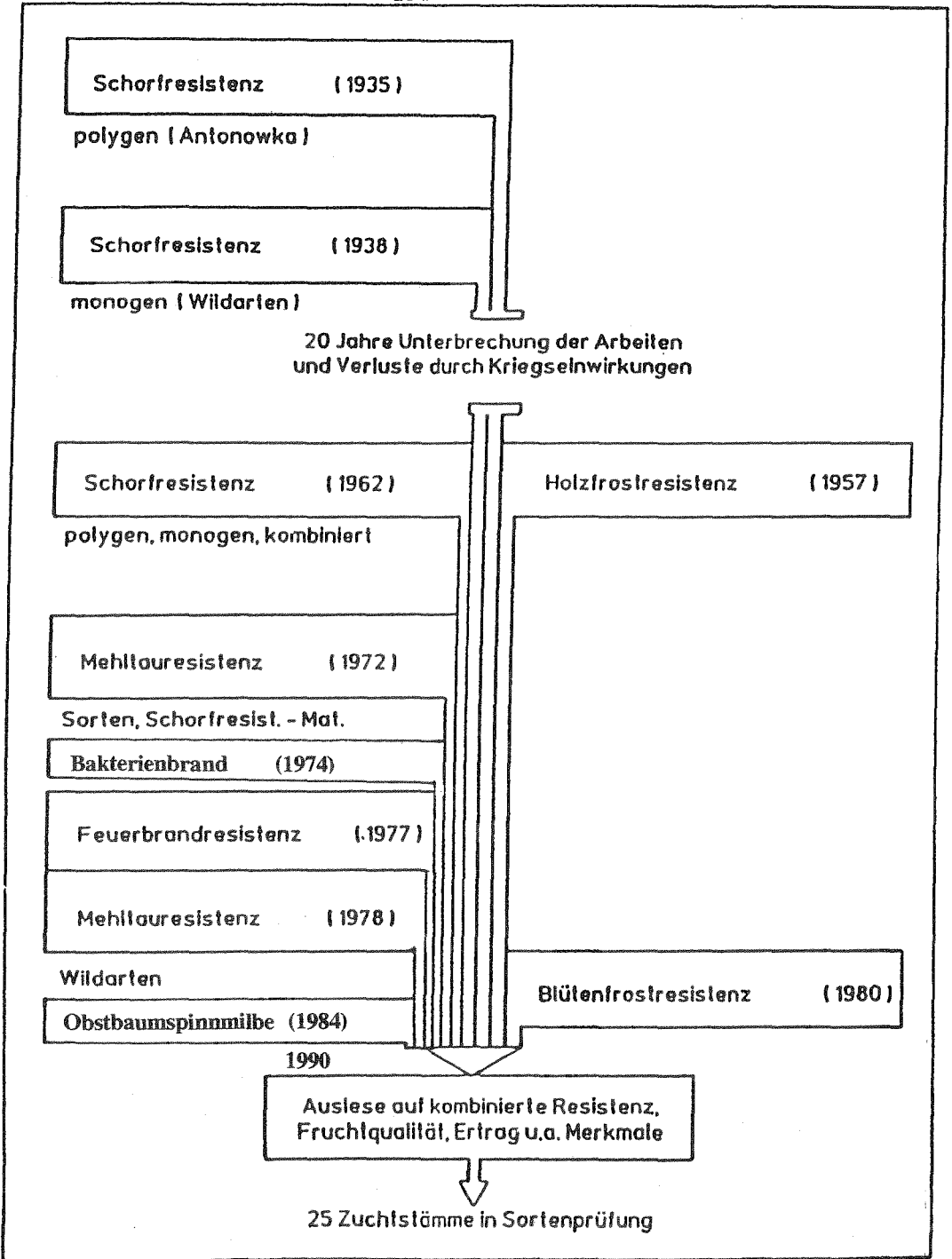


Abb. 1. Resistenzzüchtung beim Apfel – Entwicklung und Zuchtetappen mit Einordnung der biotischen und abiotischen Resistenz in das Züchtungsprogramm.

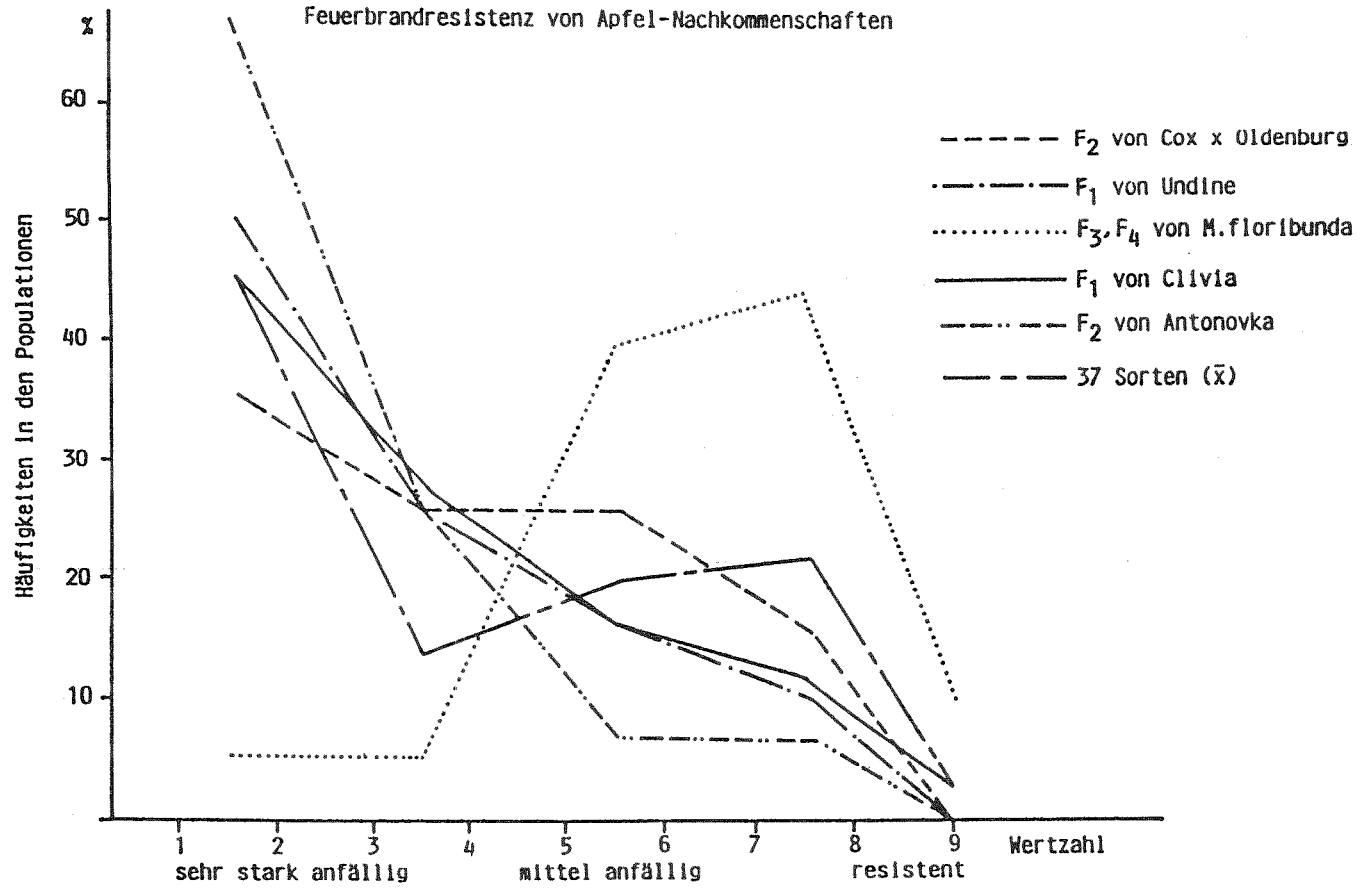


Abb. 2 : Feuerbrandresistenz von Apfelnachkommenschaften, ermittelt im künstlichen Test am Institut für Phytopathologie Aschersleben

Abb. 3: Dialleltafel - relative Häufigkeiten von Sämlingen ohne Befall mit Feuerbrand (F), Schorf (S) sowie ohne bis schwacher Befall mit Mehltau (M) 1987; geschätzte Wahrscheinlichkeiten (\hat{P}); Anzahl erforderlicher Sämlinge (n) für Selektion 1drei-fachresistenter Sämlings (FISCHER 1989).

$\begin{matrix} \diagup \text{♂} \\ \text{♀} \end{matrix}$	Idared	Pi-A-44,14	BX 44,14	Pi-AS-8,5	Pi-AS-8,28
Idared S \\ M - anfällig F /		$\hat{P}=0.005$ n=2000	$\hat{P}=0.0007$ n=115	$\hat{P}=0.0016$ n=625	$\hat{P}=0.0031$ n=322
Pi-A-44,14 S - anfällig M / F - resistent			$\hat{P}=0.0208$ n=48	$\hat{P}=0.0078$ n=128	$\hat{P}=0.0187$ n=53
BX 44,14 S \\ M - resistent F /				$\hat{P}=0.0728$ n=14	
Pi-AS-8,5 S \\ M - resistent F /					$\hat{P}=0.0519$ n=19
Pi-AS-8,28 S \\ M - resistent F /					

Parent	Idared	Pi-A-44,14	BX 44,14	Pi-AS-8,5	Pi-AS-8,28
Idared		F: 25, S: 4, M: 5	F: 17, S: 30, M: 17	F: 19, S: 42, M: 2	F: 12, S: 37, M: 7
Pi-A-44,14			F: 33, S: 35, M: 18	F: 26, S: 40, M: 3	F: 29, S: 46, M: 14
BX 44,14				F: 50, S: 56, M: 26	F: 53, S: 49, M: 54
Pi-AS-8,5					F: 30, S: 50, M: 27

Friedegunde Persiel

Aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung im Wein- und Gartenbau,
Institut für gartenbauliche Pflanzenzüchtung, Ahrensburg

Stand der Resistenzzüchtung gegen die Feuerbrandkrankheit, Erwinia amylovora
(Burr.) Winslow et al., bei Cotoneaster

Einleitung

An der Bundesforschungsanstalt für gartenbauliche Pflanzenzüchtung wurde im Jahre 1974 gemeinsam mit der Biologischen Bundesanstalt und dem Bund Deutscher Baumschulen mit der Resistenzzüchtung gegen die Feuerbrandkrankheit bei Cotoneaster begonnen.

Nach der Prüfung von 15 nicht apomiktischen Arten und Sorten auf einem Feld bei Husum in den Jahren 1974 und 1975 (Persiel, Peters und Zeller 1978) wurde zunächst mit der Auslese resistenter Pflanzen bei der bodendeckenden Art *C. dammeri* begonnen. Als bei ihr schon Fortschritte erzielt worden waren, wurden noch die aufrecht wachsenden Arten *C. franchetii*, *C. salicifolius* und *C. watereri* in das Programm aufgenommen.

1983 konnten bereits 16 resistente Klone des *C. dammeri* an eine Gruppe von Baumschulen abgegeben werden. Zwei dieser Klone erhielten Sortenschutz und sind jetzt unter den Namen *C. dammeri* "Thiensen" und *C. dammeri* "Holsteins Resi" im Handel (Lösing 1989, Persiel 1989).

Über die Fortschritte der Auslese bei *C. franchetii* bis zur 4. Generation im Jahre 1988 haben Persiel und Zeller (1990) bereits berichtet.

Die Arbeiten an *C. salicifolius* und *C. watereri* und ihre Ergebnisse sollen im folgenden Bericht vorgestellt werden.

Material und Methoden

Das Ausgangsmaterial für die Resistenzzüchtung bei Cotoneaster waren spaltende Sämlingspopulationen. In den Generationen nach 1975 wurden Nachkommen einzelner resistenter Sträucher geprüft, die von Baumschulfachleuten aufgrund ihres Wuchses und ihres Fruchtschmuckes ausgewählt worden waren. Alle Prüfungen nach 1975 fanden im Gewächshaus statt.

Ausgesät wurde im Januar in eine Mischung aus Torf und Sand.

Die Aussaaten wurden danach sechs Wochen lang im Kühlraum bei + 5°C gehalten und danach bei 15°C bis 20°C im Gewächshaus aufgestellt. Sechs Monate nach der Aussaat wurden die Sämlinge mit dem Bakterienstamm C 6/6 infiziert. Eine Suspension von 10^8 Bakterienzellen/ml wurde in 3 bis 5 Triebe jeder Pflanze injiziert.

Sechs bis acht Wochen nach der Injektion wurden die einzelnen Triebe der Pflanzen nach folgendem Schema beurteilt:

0 = keine Symptome

1 = die Spitze des infizierten Triebes ist braun

2 = die Hälfte des infizierten Triebes ist braun

3 = der ganze infizierte Trieb ist braun

4 = Übergreifen der Infektion auf nicht infizierte Triebe

5 = die Pflanze ist tot

Der aus den Triebbonituren errechnete Durchschnitt ist der Krankheitsgrad jeder Pflanze. Die Pflanzen jeder Nachkommenschaft werden aufgrund ihres Krankheitsgrades den folgenden Klassen zugeordnet:

1. resistent = Krankheitsgrad 0,0 - 1,5

2. schwach anfällig = Krankheitsgrad 1,6 - 2,9

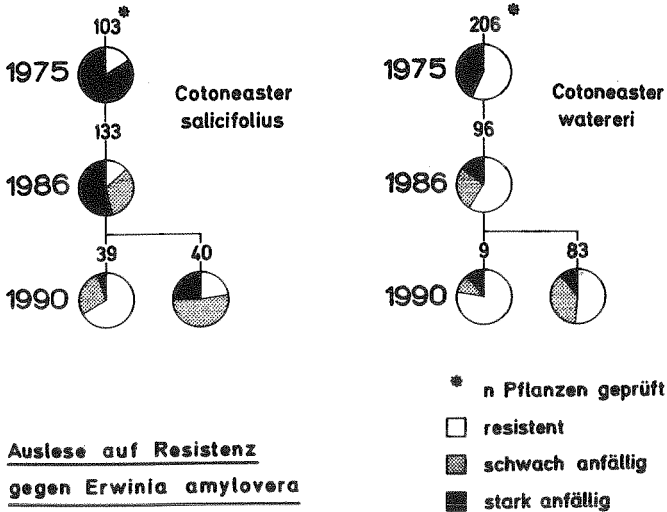
3. stark anfällig = Krankheitsgrad 3,0 - 5,0

Ausgelesen werden nur Pflanzen mit den Krankheitsgraden 0,0 bis 0,5.

Ergebnisse und Ausblick

In der Zeit zwischen 1975 und 1990 konnten bei *C. salicifolius* und *C. watereri* erst drei Generationen geprüft werden.

Die Abbildung zeigt bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Arten:



1. Für *C. watereri* schienen nach der Prüfung im Jahre 1975 mit 57 % resistenten und 43 % anfälligen Pflanzen die Voraussetzungen für die Auslese günstiger zu sein als für *C. salicifolius*, deren Population 16 % resistente und 84 % anfällige Pflanzen aufwies.
2. Doch war der Auslesefortschritt von der ersten zur dritten Generation bei *C. watereri* geringer als bei *C. salicifolius*. Die prozentualen Veränderungen in den Klassen "resistent" und "schwach anfällig" sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle: Ausleseerfolge gegen *Erwinia amylovora* bei *C. salicifolius* und *C. watereri* im Jahre 1990

Art	Nachkommenschaft	n geprüft	% Veränderung	
			resistent	schw.anfällig
<i>C. salicifolius</i>	1	39	+ 50,2	+ 28,2
	2	40	+ 6,0	+ 52,5
<i>C. watereri</i>	1	9	+ 20,5	+ 11,1
	2	83	- 6,7	+ 38,6

Der relativ hohe Anteil resistenter Pflanzen von 77,8% in der Nachkommenschaft Nr. 1 von *C. watereri* muß allerdings wegen des zu kleinen Umfanges dieser Nachkommenschaft unter Vorbehalt gesehen werden.

Gut gewachsene Pflanzen unter den ausgelesenen resistenten beider Cotoneaster-Arten sollen vegetativ vermehrt werden. Die Klone werden nach künstlicher Infektion nochmals auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen das Bakterium geprüft.

Sollten die bisher erzielten Ergebnisse dadurch bestätigt werden, könnten resistente Klone der beiden Arten in absehbarer Zeit an Baumschulen abgegeben werden.

Eine Aufzucht und Prüfung weiterer Sämlingsgenerationen wäre dann nicht mehr nötig, obwohl noch keine Homozygotie der Resistenz erreicht ist, weil *C. salicifolius* und *C. watereri* in der Praxis vegetativ vermehrt werden.

Literatur

- Lösing, H., 1989. Feuerbrandresistente Cotoneaster dammeri. Neue Landschaft 34, H 10, 665
- Persiel, Friedegunde, 1989. Gegen Feuerbrand resistente Sorten von Cotoneaster dammeri bald im Handel. Neue Landschaft 34, H 10, 665-666
- Persiel, Friedegunde and Zeller, W., 1990.
Breeding upright growing types of Cotoneaster for resistance to fireblight, Ewinia amylovora (Burr.) Winslow et al. Acta Horticulturae 273, 297-301
- Persiel, Friedegunde, Peters, Liselotte und Zeller, W., 1978.
Untersuchungen zur Feuerbrandkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. 3. Unterschiede der Anfälligkeit bei erblich aufspaltenden Nachkommenschaften von Cotoneaster-Arten und -Sorten. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 30 (7), 103-107

Teilnehmer der Feuerbrand-Tagung

13.-14. Juni 1991 im Großen Domhofsaal des Rathauses Ladenburg

Bellemann, Peter, Dr	Max-Planck-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
Berger, Friedhelm	Institut für Pflanzenschutz im Obst- bau der BBA Dossenheim
Dalchow, Jochen, Dr.	Hessisches Landesamt für Ernährung, Landwirtschaft und Landentwicklung- Pflanzenschutzdienst, Frankfurt/Main
Diehl, Thomas, Dr.	Regierungspräsidium Stuttgart
Ehrig, Fred, Dr.	Institut für Phytopathologie der BZA, Aschersleben
Falch, Karen, Dr.	Landwirtschaftskammer für das Saarland-Pflanzenschutzamt, Saar- brücken
Fischer, Christa , Prof. Dr.	Institut für Obstforschung Dresden- Pillnitz
Fried, Arno	Regierungspräsidium Karlsruhe
Geider, Klaus, Prof. Dr.	Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
Geier, Gebhardt	Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg
Graf, Heiner, Dr.	Obstbauversuchsanstalt Jork
Gündel, Lutz, Dr.	Landespflanzenschutzamt Rheinland- Pfalz, Mainz
Henseler, Kurt, Dr.	Pflanzenschutzamt Bonn
Knewitz, Horst	Landespflanzenschutzamt Rheinland- Pfalz, Mainz
Knösel, Dieter, Prof. Dr.	Institut für Botanik, Universität Hamburg
Krauthausen, Hermann- Josef, Dr.	Landespflanzenschutzamt Rheinland- Pfalz, Mainz
Krebs, Ernst-Kurt, Dr.	Pflanzenschutzamt der Landwirtschaftskammer Hannover
Lederer, Werner, Dr.	Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der BBA Dossenheim
Lösing, Heinrich	Versuchs- und Beratungsring, Pinneberg
Mappes, Dietrich, Dr.	BASF Limburgerhof
Mende, Astrid	Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der BBA Dossenheim
Michel, Hans-Günther	Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart
Moltmann, Esther, Dr.	Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart
Müller, Petra, Dr.	Biologische Zentralanstalt, Klein- machnow
Nachtigall, Marion, Dr.	Institut für Phytopathologie der BZA, Kleinmachnow
Pahl, Armin	Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg
Persiel, Friedegunde	Institut für gartenbauliche Pflanzen- züchtung der BFA für Züchtungsfor- schung im Wein- und Gartenbau, Ahrens- burg

Richter, Klaus, Dr.	Institut für Phytopathologie der BZA, Aschersleben
Rieck, Monika Riedel, Martin, Dr.	Institut für Botanik der TH Darmstadt Bayrische Landesanstalt für Bodenkul- tur und Pflanzenbau, München
Sadowska-Rybak, Malgozeta, Dr. Schlegel, Christian, Dr.	Institut für Angewandte Botanik der Universität, Hamburg Landwirtschaftsamt Ladenburg, Arbeits- gruppe Übergebietliche Pflanzen- schutzberatung
Seidel, Mechthild, Dr.	Landespflanzenschutzamt Mecklenburg- Vorpommern, Rostock
Ullrich, Wolfram, Prof. Dr. Ullrich, Cornelia, Dr. Vogelsanger, Jakob	Institut für Botanik der TH Darmstadt Institut für Botanik der TH Darmstadt Eidgenöss. Forschungsanstalt für Obst- Wein- und Gartenbau, Wädenswil
Wahl, Rainer	Bezirkspflanzenschutzamt Pfalz, Neu- stadt/W.
Zeller, Wolfgang, Dr.	Institut für Pflanzenschutz im Obstbau der BBA Dossenheim