

Förderkennzeichen: 2811ERA004

„Entwicklung einer verlässlichen Vor-Ort-Erkennung und einer innovativen epidemiologischen Diagnostik für den Feuerbrand-erreger *Erwinia amylovora* in Wirtspflanzenbeständen.“

Abschlussbericht zum Arbeitspaket 3

Projektlaufzeit: 15.09.2012-14.09.2014

Projektleitung: Dr. Annette Wensing

Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau
Schwabenheimer Straße 101
69221 Dossenheim
Tel.: 06221-86805-10
Fax: 06221-86805-15
Email: Annette.Wensing@jki-bund.de

Projektziel:

Nachweis und Quantifizierung des Feuerbranderregers spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Prognose-Modellen und Bekämpfungs-Strategien. Neben der Weiterentwicklung von spezifischen Nachweisverfahren ist es dabei auch wichtig Umweltparameter, die die Entwicklung des Pathogens beeinflussen möglichst exakt zu erfassen. Im EUPHRESCO Projekt PHYTFIRE wurde geprüft, inwiefern sich neue Diagnose-Techniken wie die isothermale PCR, neue spezifische PCR Protokolle oder neue Varianten zur Probensammlung zur Analyse der Entwicklung des Feuerbranderregers und der begleitenden Mikroflora anwenden lassen. Im hier berichteten Arbeitspaket 3 wurde eine Methode, die auf dem Vergleich von Protein-Profilen basiert getestet. Dazu wird über MALDI-TOF Massenspektrometrie ein Art-typisches Profil der kleineren (bis ca. 20 kDa) Proteine aus ganzen Zellen oder einem einfachen Zellaufschluß aufgenommen. Im Abgleich gegen Referenzspektren kann so die Art bzw.

Gattungszugehörigkeit eines neuen Isolats bestimmt werden. Die Methode ist sehr schnell und erlaubt die parallele Analyse von 96 Proben je Probenträger. Bislang wird die Technik überwiegend im klinischen Bereich eingesetzt. Die Übertragung der Methode auf komplexere Proben zu Populations-Studien in Umwelt-Habitaten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Im hier vorgestellten Projekt wurde die Anwendung zur Analyse der Blütenbesiedlung während der Feuerbrandbehandlung geprüft. Einen Überblick über die übrigen Arbeitspakete gibt der in Anlage 1 beigefügte Final-Project Report des Gesamtprojekts.

1. Ablauf des Projekts

1.1 Laborversuch zur Probennahme

Unter Laborbedingungen wurde geprüft, welchen Anteil einer Population eine einzelne Bakterienart mindestens stellen muss um noch über MALDI-TOF basierte Verfahren nachgewiesen werden zu können. Dazu wurden Zellsuspensionen verschiedener Bakterienarten in bekannter Dichte gemischt und anschließend per MALDI-TOF MS Analyse geprüft. Als Vergleichspaare wurden Reinkulturen von *Erwinia amylovora*, *Erwinia tasmaniensis* und *Escherichia coli* verwendet. Diese 3 Bakterienarten gehören zu den Gram-negativen Enterobakterien, die Proteinspektren der beiden eng verwandten Erwinien-Arten zeigen eine größere Übereinstimmung. Die Firma Bruker hat mehrfach eine Ergänzung ihrer Software um ein Modul zur Analyse von Mischkulturen angekündigt. Im Projekt konnte eine Test-Version dieser Mischkulturanalyse angewendet werden.

1.2 Freilandversuch zur Probennahme

In der Freilandversuchsanlage des JKI in Mannheim/Kirschgartshausen können Feldversuche mit dem Quarantäneschaderreger *E. amylovora* durchgeführt werden. Im Rahmen des PHYTFIRE Projekts sollten daher Proben von unbehandelten Apfelblüten, und von solchen auf denen der Feuerbranderreger

bzw. mikrobielle Antagonisten ausgebracht wurden verglichen werden. Die Entwicklung der Besiedlung nach Inokulation/Behandlung der Blüten über die Dauer des Feuerbrandversuchs (ab Beginn der Blüte bis zum Auftreten von Feuerbrandsymptomen) wurde untersucht. Dabei wurde die Probennahme für einen größeren Probendurchsatz zu optimieren um auch die Analyse von Einzelblüten zu ermöglichen. Die Verteilung des Feuerbänderregers in einer Anlage ist sehr ungleichmäßig. Daher wird üblicherweise eine größere Anzahl Blüten in einer Mischprobe ausgewertet. Einzelblütenanalyse sollte die Unterscheidung von hohen Bakteriendichten auf wenigen Einzelblüten von einer stärker verteilten Bakterienpopulation in niedrigerer Dichte ermöglichen.

1.3 Anpassung Medium/Temperatur

Da für die Identifikation über MALDI-TOF in jedem Fall ein Kultivierungszwischenschritt benötigt wird, sollte getestet werden in welchem Maß sich Wachstumsbedingungen (verwendetes Medium, Wachstumstemperatur) auf das Ergebnis auswirkt. Dazu wurden gleiche Ausgangsproben nach Vorkultivierung unter verschiedenen Anzuchtbedingungen verglichen.

1.4 Anzahl der getesteten Kolonien je Probe

Da in der Blütenbesiedlung Gemische aus unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen erwartet wurden, sollte geprüft werden, welche Anzahl von Einzelkolonien pro Blütenprobe im MALDI-TOF analysiert werden muss, um ein repräsentatives Bild der Zusammensetzung zu erhalten. Dabei wurde mit anderen Verfahren wie z.B. qPCR verglichen werden wie Aussagekräftig das MALDI-TOF Ergebnis ist.

1.5 Abgleich zwischen verschiedenen Laboren

MALDI-TOF Systeme zur Identifikation von Mikroorganismen werden derzeit von 2 Firmen (Bruker und bioMérieux) vertrieben. Es sollte getestet werden, in wie weit Daten zwischen den verschiedenen Laboren und Systemen ausgetauscht werden können. Die Anpassung an zwei open-source Programme

(MALDIquant und BIOSPEAN Gibb and Strimmer (2012), (Raus and Šebela 2013) wurde in den Arbeitsplan aufgenommen.

2. Durchgeführte Arbeiten und erreichte Ziele

2.1 Laborversuch zur Probennahme

Reinkulturen von *Erwinia amylovora*, *Erwinia tasmaniensis* und *Escherichia coli* wurden auf gleiche Zelldichte eingestellt. Jeweils 2 Arten wurden in abgestuften Mischungsverhältnissen gemischt und die so erhaltene Suspension im MALDI-TOF analysiert. Dabei konnten sowohl die Gattungs-fremde Mischung zwischen *Erwinia* und *E. coli* unterschieden werden, wenn mehr als 1/5tel der Probe beigemischt waren. War die zweite Art nur mit 1/5tel bis 1/10tel der Gesamtzellen beigemischt, wurde die „Verunreinigung“ nicht in jedem Fall erkannt. Allerdings ergaben auch die gemischten Proben mit geringerer Beimischung eine klare Identifikation der dominanten Art. Das „Mischspektrum“ konnte also im Vergleich zur Referenzdatenbank noch eindeutig zugeordnet und ausgewertet werden. Bei der Mischung der beiden *Erwinia* Arten wurden nur bei gleichen Mischungs-Anteilen beide Arten zuverlässig erkannt (Abbildung 1). Über direkte Analyse von Mischkulturen lassen sich also Arten, die nur einen kleinen Teil der Gesamtpopulation ausmachen nicht zuverlässig nachweisen. Allerdings zeigen diese Ergebnisse auch eine deutlich geringere Auswirkung von kleineren Beimischungen auf die Identifikation der dominanten Art als erwartet. Die Mischspektren wurden in der überwiegenden Zahl der Proben korrekt dem dominanten Proteinmuster zugeordnet und nicht als unbekanntes Proteinpatternerworfen. Dadurch ergab sich für die Analyse von Blütenproben die Möglichkeit, viele Einzelproben schnell und mit hohem Durchsatz direkt auf das dominante Pattern zu untersuchen.

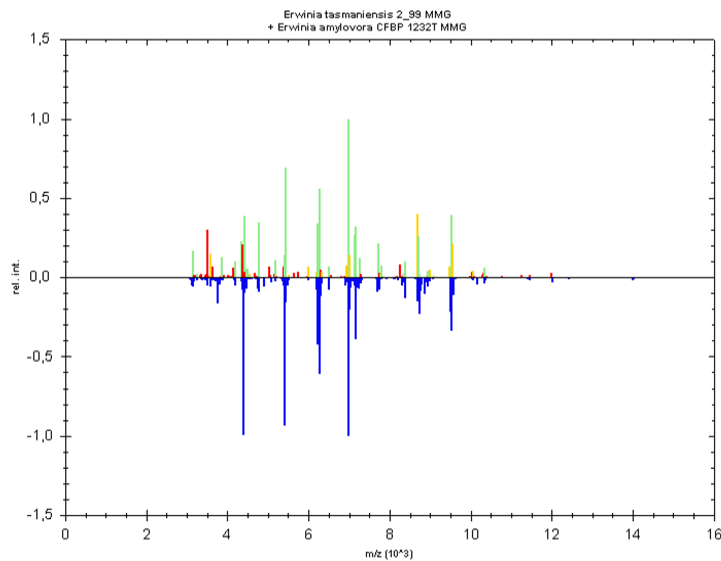


Abbildung 1: Identifikation einer Mischkultur aus *E. amylovora* und *E. tasmaniensis* über die Bruker Software Biotyper. Das obere Panel zeigt das Proteinspektrum der Probe, das nach unten aufgetragene Panel das der Referenz. Farbig dargestellt sind Übereinstimmungen (grün), Abweichungen (rot) und teilweise Übereinstimmungen (gelb) der Proteinpeaks.

2.2 Freilandversuch zur Probennahme

In der Versuchsanlage Kirschgartshausen wurden während der Apfelblüte im Frühjahr 2013 und 2014 Proben von unbehandelten oder mit Feuerbrandantagonisten behandelten Apfelblüten genommen und auf ihre mikrobielle Besiedlung analysiert. Dazu wurden die 3-jährige Bäume (Gala Royal) markiert und beprobt. Zur Vollblüte wurde ein Teil der Bäume entweder mit *E. tasmaniensis* oder mit *Bacillus amyloliquefaciens* behandelt. Auf die Hälfte der markierten Bäume (unbehandelt und behandelt) wurde zusätzlich der Feuerbranderreger *E. amylovora* ausgebracht. Ab dem Zeitpunkt der Behandlung/Inokulation wurden über 4 Wochen im wöchentlichen Abstand Blüten/Fruchtansätze entnommen. Alle Varianten wurden 3-fach (2013) bzw. 4-fach (2014) wiederholt geprüft, je Baum wurden mindestens 3 Blüten bzw. Fruchtansätze analysiert. Die Blüten wurden im Labor 10 min in sterilem Wasser geschüttelt, das Pflanzenmaterial entfernt und die so erhaltene Waschprobe für die weitere Analyse aufgeteilt. Von jeder Probe wurde zur direkten PCR Analyse ein Tween-Lysat erstellt und für eine BIO-PCR (Lebendzellen) eine 1ml

Übernacht-Kultur beimpft. Vom Rest der Waschprobe wurden 2x 5µl auf Vollmedium (Standard I) und Minimalmedium (MM2c) getropft um Einzelkolonien zu erhalten (Abbildung 2).



Abbildung 2: Tropfplatten zur Kultivierung von Einzelkolonien aus Blütenproben. Getropft wurden jeweils 5 µl einer Blütenwaschprobe.

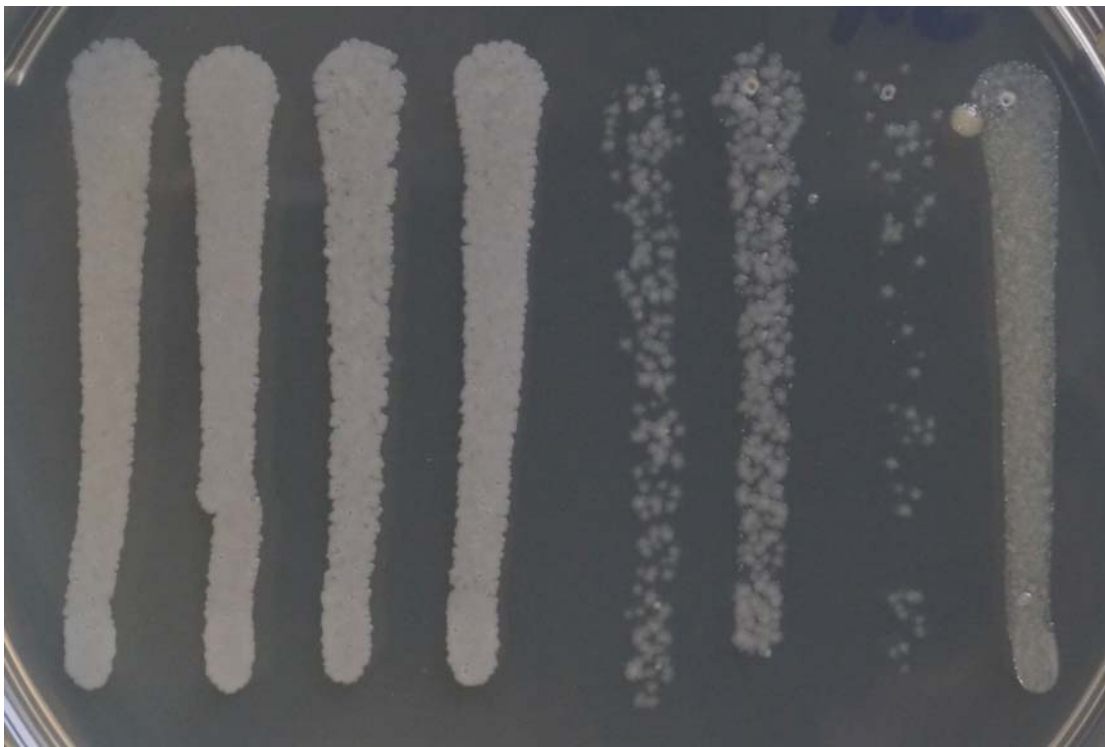


Abbildung 3: Verlaufsplatten zur Kultivierung von Einzelkolonien aus Blütenproben. Getropft wurden jeweils 5 µl einer Blütenwaschprobe. Zur weiteren Verdünnung wurden die 5 µl Tropfen auf der Petrischale verlaufen lassen. Durch die geringe Probenmenge und die Verteilung über das Nährmedium konnten so für alle Blütenproben mit nur einem zusätzlichen Verdünnungsschritt Einzelkolonien erhalten werden. Durch das Format können 8 Proben/Platte analysiert werden. Ein hoher Probendurchsatz ist über Verwendung von Mehrkanalpipetten und 96-well Platten möglich.

Um schwankende Zelldichten in den Waschproben auszugleichen und in jedem Fall Einzelkolonien zu erhalten, wurden zusätzlich Verlaufsplatten (Abbildung 3) und getropfte Platten einer 1:10 Vorverdünnung erstellt. Die aus den Waschproben beimpften Übernacht-Kulturen stellen einen ersten

Anreicherungsschritt dar, bei der die prozentuale Zusammensetzung dieser Kultur nicht automatisch die der Ausgangsprobe widerspiegelt.

Über die Verwendung von Mehrkanalpipetten, die Verdünnung in 96-well Platten und das Tropfen von kleinen Volumina war es möglich, die zeitgleiche Aufarbeitung einer großen Anzahl an Proben zu vergleichen. Im Vergleich zum klassischen Handling (= Ausplattieren) konnten wir keine reduzierte Diversität in den kleinen Probenvolumina feststellen. Allerdings zeigte sich in beiden Versuchsjahren für die Einzelproben eine deutlich niedrigere Diversität als erwartet. Wie auch in Abbildung 2 und 3 zu sehen ist, ergaben die einzelnen Waschproben nur eine sehr begrenzte Anzahl an unterschiedlichen Koloniemorphologien. In unseren Proben wurde diese Diversität weder durch Analyse größer Volumina, noch durch andere Anzuchtbedingungen erhöht.

Die wiederholte Analyse der gleichen Proben ergab ebenfalls ein einheitliches Bild. Im ursprünglichen Arbeitsplan war vorgesehen, eine Art „minimale Anzahl“ zu untersuchender Einzelkolonien je Probe zu ermitteln, mit der die Zusammensetzung der Einzelprobe einigermaßen genau wiedergegeben werden könnte. Aufgrund der unerwartet homogenen Zusammensetzung der Proben konnte diese Festlegung nicht wie geplant (siehe 1.4) erfolgen. Stattdessen wurden verschiedene Analysen von Mischproben zur Bestimmung des „dominanten“ Protein-Patterns verglichen. Es wurde von Nähragar Zellmaterial aus Einzelkollonien oder aus einem Mischtropfen auf das MALDI-target aufgetragen. Demgegenüber wurde etwas Zellsuspension aus einer Übernachtkultur der Waschprobe analysiert. Die Probenvorbereitung für alle drei Varianten konnte durch direkte Lyse des Zellmaterials auf dem Edelstahl-target vereinfacht werden. Für die jeweiligen Einzelproben ergaben sich für Zellsuspension bzw. Zellmaterial von Einzel- und Mischkolonien und gemischte Zellen sehr ähnliche Protein-Profile. Lediglich von sehr kleinen Ausgangskolonien konnte nicht genug Zellmaterial für die Analyse übertragen werden. Um einen ersten Methodenabgleich durchzuführen, wurden Tween-Lysate von Waschproben, aufgereinigte DNA aus Waschproben und Tween-Lysate aus Übernachtkulturen (BIO-PCR) auf den Feuerbranderreger sowie die

ausgebrachten Antagonisten getestet. Durch die gleichzeitige Anreicherung lebender Zellen (gegenüber blanker DNA) und die Verdünnung pflanzlicher PCR-Inhibitoren eignen sich Zwischenkulturen gut für einen sensitiven Nachweis lebender Zellen, auch wenn die quantitative Zusammensetzung einer solchen Probe nicht automatisch der der Ausgangsprobe entspricht. Über die Kit-Aufreinigung konnte gegenüber der Tween-lysierten Waschprobe kein sensitiverer Nachweis beobachtet werden. Die Bio-PCR über Zwischenkultivierung ergab wie erwartet für die meisten positiven Proben eine Anreicherung des PCR Produkts. Nur bei wenigen Proben wurde eine schwache PCR Reaktion in der Waschprobe beobachtet, die sich über die BIO-PCR nicht bestätigen ließ. Hier ist zu erwarten, dass in der Waschprobe entweder nur DNA aus toten Zellen enthalten war oder die wenigen lebenden Zellen des Zielorganismus bei der Zwischenkultivierung von einer anderen Art verdrängt wurden.

2.3 Anpassung Medium/Temperatur

Zur Bewertung verschiedener Anzuchtbedingungen wurde die beobachtete Diversität in der Analyse herangezogen. Verglichen wurden dazu Koloniemorphologie und MALDI-TOF Identifikation der jeweiligen Einzelkulturen. Im Vergleich zwischen Minimalmedium und Komplexmedium zeigten die Proben auf Komplexmedium eine etwas höhere Diversität. Hier wurden mehr Arten gefunden und nicht nur Bakterien sondern auch Hefen konnten nachgewiesen werden. Eine erhöhte Wachstumstemperatur (größer 30°C) führte zu einer selektiven Anreicherung einzelner Organismen, z.B. von *Bacillus* und *Pantoea* Spezies, Diversität ging verloren. Eine gekühlte Inkubation (18°C) zeigte keine größere Diversität, so dass für die Proben eine Inkubation bei 28°C auf Komplexmedium ausgewählt wurde.

2.4 Anzahl der getesteten Kolonien je Probe

Innerhalb der einzelnen Blütenproben zeigte sich unter den kultivierbaren Arten eine deutlich geringere Diversität als erwartet. Sehr selten konnten mehr als 5

unterschiedliche Kolonie-Typen in einer Probe beobachtet werden. Im Großteil der Proben waren nur ein oder zwei Kolonietypen vorhanden. Daher wurde zunächst die Anzahl der je Probe analysierten Einzelkolonien von einem Target je Probe (=96 Kolonien) zunächst auf 8-16 heruntergesetzt. Nachdem sich dieses Bild auch mit den Proben des 2. Projektjahres nicht änderte und aufgrund der guten Ergebnisse für Mischprobenanalyse wurde in 2014 der Großteil der Proben nicht mehr in Analyse von Einzelkollonien sondern als Mischprobe getestet. Diese geringe Diversität liegt unter den Erwartungen und entspricht nicht anderen veröffentlichten Ergebnissen (siehe Diskussion). Eine weitere Absicherung über unabhängige Methoden ist zwingend erforderlich, konnte im Rahmen der kurzen Projektlaufzeit allerdings nicht mehr erfolgreich abgeschlossen werden. Erste Versuche aus den für die MALDI-TOF Analyse gesammelten Waschproben geeignete Aufreinigungen für Next-Generation-Sequencing (NGS) schlugen fehl. Der qualitative Art-Nachweis durch das MALDI-TOF Verfahren wurde für die Projektproben durch Isolation und PCR bestätigt. Ohne weitere Bestätigung durch eine unabhängige Methode sind die im Projekt gewonnenen Ergebnisse zur Zusammensetzung der Blütenpopulationen nur mit Vorbehalt quantitativ zu bewerten.

2.5 Abgleich zwischen verschiedenen Laboren

Das größte Problem für den angestrebten Laborvergleich zwischen MALDI-TOF Ergebnissen der einzelnen Projektpartner stellt der Zugang zum System (Gerät und vor allen Dingen Auswertungssoftware) dar. Für das JKI Dossenheim konnten bestand freundlicherweise Zugang zum Bruker System über die Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Uniklinik Heidelberg. Ursprünglich war geplant, diese durch klinische Routine Proben begrenzte Kapazität durch ein „Einzelprobensystem“ Firma Anagnos Tec (Saramis System) zu erweitern (target on demand). Mit der Übernahme der Saramis Software von der Firma bioMérieux war dieser Kauf von Einzelanalysen jedoch nicht mehr verfügbar. Da neben dem Gerätezugang auch die Verfügbarkeit der Auswertungssoftware stark begrenzt ist (Bruker Version Biotyper kleinstes

Softwarepaket ca. 50.000€ da auch hier eine günstigere Variante ohne Datenbank nicht mehr vertrieben wird, wurde nach Alternativen gesucht.

Ein neu veröffentlichtes, nicht kommerzielles online-Tool zur Identifikation von Mikroorganismen über MALDI-TOF könnte hier die Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Laboren erheblich verbessern. Das web-Tool ist nach kostenloser Registrierung frei zugänglich und kann so von verschiedenen Projektpartnern genutzt werden. Die Analyse von auf verschiedenen Geräten erzeugten Spektren ist möglich. Das BIOSPEAN Programm bringt keine Referenzdatenbank mit, sondern wird von jedem Wissenschaftler über eigene Referenzen verwendet die mit Kollegen geteilt werden können (Raus and Šebela 2013). Ein zweites Programmpaket, MALDIquant (Gibb and Strimmer 2012), ermöglicht den Export/Import von MALDI-TOF MS Spektren aus unterschiedlichen (teils auch Herstellergebundenen) Formaten. Die Qualitätsprüfung und Anpassung (Baseline-subtraction, Verrechnung mehrerer Einzelspektren zu einer Referenz etc.) von Spektren kann in MALDIquant ebenso durchgeführt werden. Eine Programm-Vignette zur Spezies Zuordnung wurde vom Programmator zusammengestellt. Beide Softwarepakete wurden in diesem Projekt erfolgreich eingesetzt. Für die Projektpartner wurden kurze, keine Vorkenntnisse erfordernde „step-by-step“ Protokolle zusammengestellt (Anlage 2 und 3). Zum Start einer projektrelevanten Referenzdatenbank wurden alle in der Arbeitsguppensammlung verfügbaren Typstämme, Stammsammlungsstämme und besonders gut charakterisierten Isolate per Sequenzierung verifiziert, auf dem Bruker microflex analysiert und mithilfe von MALDIquant als neue Referenz-Spektren angelegt. Die knapp 50 Referenzen wurden in BIOSPEAN eingespeist und können nun frei genutzt werden.

2.6 Ergebnisse aus den Freilandversuchen

In beiden Versuchsjahren zeigte sich eine unerwartet geringe Diversität in der Blütenbesiedlung. Auf unbehandelten Blüten wurden überwiegend *Pseudomonas* Arten, *Pantoea agglomerans*, *Erwinia* sowie Hefen der Gattungen *Aureobasidium* und *Metschnikowia* nachgewiesen. Wie zu erwarten überwog auf den mit

Antagonisten behandelten Blüten die jeweils ausgebrachte Art (*E. tasmaniensis* bzw. *B. amyloliquefaciens*). In beiden Versuchsjahren war der *Bacillus* über einen längeren Zeitraum nachweisbar, dafür lag der Anteil der negativen Proben etwas höher als bei *E. tasmaniensis*. Über qPCR bestimmte Ausgangszelldichten in den Waschproben lagen mit zwischen 10^4 bis 10^6 cfu pro Blüte recht hoch. Beide Antagonisten wurden etwa mit gleicher Häufigkeit auf Blüten unbehauelter Nachbarbäume nachgewiesen. Mit Abwurf der Kronblätter/Ausbildung der Fruchtsätze ging der Anteil *E. tasmaniensis* positiver Proben deutlich zurück. Es wurden vermehrt *P. agglomerans* verschiedene *Bacillus* Spezies bzw. auch *E. amylovora* nachgewiesen.

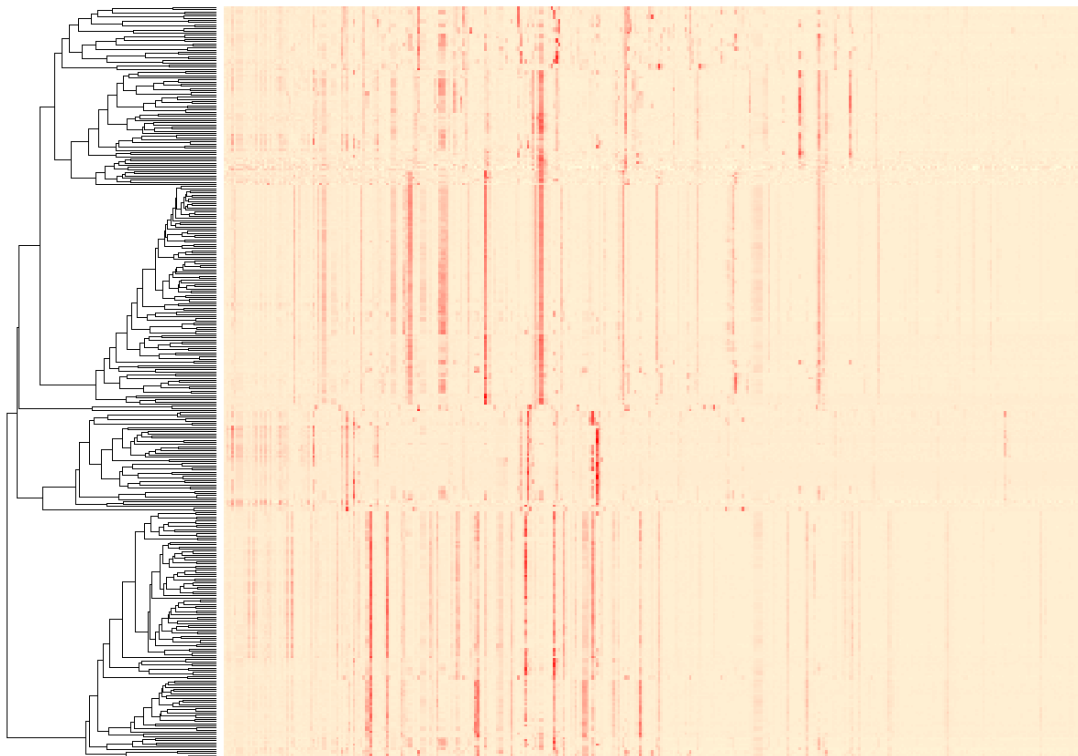


Abbildung 4: Spektrenvergleich aus gemischten Waschproben von Einzelblüten. Die Protein-Spektren sind als Barcodegrafik gezeigt (rechts) über MALDIquant zu einer Ähnlichkeitsmatrix verrechnet und als „Stammbaum“ dargestellt. Die Darstellung ist eine optische Hilfe zur Spektrengruppierung und entspricht nicht einem taxonomischen Stammbaum. Allerdings sieht man recht gut die Übereinstimmung zwischen Probenwiederholungen (unterste Verzweigung) und Ähnlichkeiten innerhalb einer Gattung (mittlere Ebene). Durch den Patternvergleich lassen sich so auch unbekannte Arten innerhalb eines Probenatzes gruppieren. Der Probenumfang für nachfolgende Identifikationsschritte - wie Sequenzierung- kann deutlich minimiert werden.

3. Diskussion

Die im PHYFIRE Projekt durchgeführten Arbeiten bestätigen die generelle Eignung von Protein-Pattern basierter Identifikation von Mikroorganismen für die Analyse von Blütenbesiedlung. Die entscheidenden Vorteile dieser Methode sind zum einen die unkomplizierte und preisgünstige Probenaufarbeitung, zum anderen die „ungerichtete“ Identifikation über das Art-spezifische Proteinpuster. Ohne Vorauswahl von Primern für z.B. eine bestimmte Gattung/Art können mit der MALDI-TOF ID Methode sowohl Bakterien als auch Hefen, mit wenigen Anpassungen auch filamentöse Pilze identifiziert werden. Anders als beim gezielten PCR Nachweis erhält man so auch für unerwartete Arten ein Ergebnis, sind diese nicht in der Referenzdatenbank enthalten so kann man sie selber als nicht-zugeordnete Spektren hinterlegen und gegen spätere Proben abgleichen.

Durch diese Grundvoraussetzung eignet sich die MALDI-TOF ID besonders für hohen Probendurchsatz und rückt damit mehr und mehr auch in das Interesse der mikrobiellen Ökologie (Ferreira, Sanchez-Juanes et al. 2011, Uhlik, Strejcek et al. 2011, Kurzawova, Stursa et al. 2012). Gegenüber der Rhizosphäre und der der Phyllosphäre sind zur mikrobiellen Besiedlung der Blüten deutlich weniger Daten vorhanden (Alekkett, Hart et al. 2014).

Durch die aktuellen Entwicklungen im Bereich Metagenomics/NGS werden verstärkt auch solche „exotischeren“ Habitate analysiert. Eine aktuelle NGS-Studie aus den USA stellt (ebenfalls vor dem Hintergrund der Feuerbrandproblematik) neue Daten zur Besiedlung von Apfelblüten vor (Shade, McManus et al. 2013). Mit dem nicht Kultivierungs-abhängigen Ansatz kommt die Studie im Gegensatz zu unseren Daten zu dem Ergebnis, das die Diversität auf Apfelblüten sogar deutlich höher ist als erwartet. Im Rahmen der Sequenzanalysen wurden um die 1600 verschiedenen „taxonomic units“ definiert. Diese Diskrepanz kann verschiedenste Ursachen haben. So ist zu erwarten, dass eine vom mikrobiellen Wachstum in Kultur abhängige Methode immer eine geringere Diversität aufweist als eine rein Sequenz-basierte Methode. Zudem wurde in der Arbeit von Shade et al. Blütenmischproben

(moderate Größe, 15 Einzelblüten/Probe) untersucht. Beide Punkte beeinflussen das zu erwartende Artenspektrum, eine so starke Abweichung allein durch diese Faktoren erscheint jedoch unrealistisch. Weitere Unterschiede zwischen den Studien sind z.B. das Alter der Versuchsbäume (15 Jahre gegenüber 3 Jahren) und die Umgebung der Anlage (fest stehende Obstanlage gegenüber Versuchsanlage mit frisch gepflanzten Bäumen in bewusster gewählter Quarantänelage) sowie das Alter der analysierten Blüten (frische Blüten bis zu einer Woche, Blüten und Fruchtsätze über 4 Wochen). All diese Faktoren begünstigen eine hohe Diversität für die Studie von Shade et al. und niedrige Diversität für unsere Proben. Welches Ergebnis eher dem tatsächlichen Zustand auf der Blüte entspricht, wenige dominante Arten oder viele kleine Mikrohabitate mit hoher Diversität kann nach derzeitiger Datenlage nicht beantwortet werden. Beide Techniken zusammen genommen könnten sich hierbei in Zukunft gut ergänzen und eine Abschätzung zwischen maximal möglicher Diversität und tatsächlichem Anteil auf der Blüte ermöglichen. Die Vor- und Nachteile beider Ansätze komplementieren sich sehr gut.

Ein erster Versuch, beide Methoden bereits direkt in diesem Projekt zu vergleichen schlug leider fehl. Bei der Aufarbeitung unserer Waschproben für die NGS stießen wir auf Probleme von einer einzelnen Blüte genug Material zu gewinnen. Gleiches geben Shade et al. als Grund für die Wahl von Blütenmischproben an.

Auch wenn die quantitative Auswertung unserer PHYTFIRE Proben aus den genannten Gründen nur eingeschränkt möglich ist, konnte im Rahmen des Projekts eine erfolgreiche Durchführung als „proof-of-principle“ erarbeitet werden. Mit der hier vorgestellten Methode war eine Probenanalyse im benötigten Umfang möglich. Von den behandelten/inokulierten Blüten wurden die erwarteten Spezies nachgewiesen und die PCR Analyse der Proben stimmte gut mit der Identifikation per MALDI-TOF überein.

4. Erläuterung zu Position 0843 und 0846 der Ist-Ausgaben

Im Abrechnungsjahr 2014 wurde unter Position 0843 (sonstige sächliche Verwaltungsausgaben) 7183,01€ an Ist-Ausgaben getätigt, veranschlagt waren 7000€. Die Mehrausgaben von 183,01€ wurden innerhalb der 20% Regelung durch in Position 0846 (Reisekosten) nicht abgerufene Mittel gedeckt. Es wurden Verbrauchsmaterialien zur Anzucht der verschiedenen Mikroorganismen, Chemikalien zur Aufarbeitung der DNA aus den isolierten Mikroorganismen sowie PCR Verbrauchsmaterial, Nukleotide und Taq-Polymerase und Sequenzreaktionen eingekauft. Von den bewilligten Reisemitteln (Position 0846, 1000€) wurde die Teilnahme am Abschlusstreffen des Projekts vom 13.-15. Mai 2014 in Nevsehir in der Türkei finanziert. Zusätzliche Personalmittel standen nicht zur Verfügung.

5. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse innerhalb des Projekts und Ausblick

Im Projekt konnte erfolgreich ein Protokoll zur Identifikation von kultivierbaren Mikroorganismen aus Blütenpopulationen entwickelt werden. Das Protokoll ermöglicht einen hohen Probendurchsatz bei vertretbarem Arbeits- und Materialaufwand und erlaubt somit gerade für ein recht kleingliedriges Habitat wie eine Apfelblüte den notwendigen Vergleich von Einzelblüten.

Durch die Verwendung von Ausgangsproben aus einer sehr definierten Umgebung (Feuerbrandversuchsanlage in Quarantänelage, unbehandelte und gezielt behandelte/inokulierte Bäume) stand ein überschaubarer Probensatz zur Verfügung. Vermutlich ergibt sich in länger kultivierten Apfelanlagen ein diverseres Bild der mikrobiellen Blütenbesiedlung, für die Methodenetablierung war die reduzierte Komplexität der Proben hilfreich. Durch die gezielte Ausbringung bakterieller Antagonisten auf einen Teil der analysierten Blüten konnten etablierte Techniken wie Art-spezifische PCR und qPCR zur Prüfung der MALDI-TOF Ergebnisse herangezogen werden.

Das verwendete Protokoll erwies sich als reproduzierbar und robust und ließ sich auf eine Auswertung durch frei verfügbare open-source Software anpassen. Die Protokolle dazu wurden auf der Projekthomepage zur Verfügung gestellt, eine kostenfrei zugängliche Referenzdatenbank wurde gestartet.

Dieser Projektteil wurde unter anderem beim DPG-Arbeitskreis Phytobakteriologie und beim 5-Ländertreffen Feuerbrand vorgestellt. Bei beiden Tagungen sind mit der Diagnose von Phytopathogenen beschäftigte Vertreter von Pflanzenschutzdiensten und Beratungsorganisationen anwesend.

Literatur

Aleklett, K., M. Hart and A. Shade (2014). "The microbial ecology of flowers: An emerging frontier in phyllosphere research1." Botany **92**(4): 253-266.

Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, P. Garcia-Fraile, R. Rivas, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, J. M. Gonzalez-Buitrago and E. Velazquez (2011). "MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae." PLoS One **6**(5): e20223.

Gibb, S. and K. Strimmer (2012). "MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data." Bioinformatics **28**(17): 2270-2271.

Kurzawova, V., P. Stursa, O. Uhlik, K. Norkova, M. Strohalm, J. Lipov, L. Kochankova and M. Mackova (2012). "Plant-microorganism interactions in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil." N Biotechnol.

Raus, M. and M. Šebela (2013). "BIOSPEAN: A freeware tool for processing spectra from MALDI intact cell/spore mass spectrometry." Journal of Proteomics and Bioinformatics **6**(12): 283-287.

Shade, A., P. S. McManus and J. Handelsman (2013). "Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome." MBio **4**(2).

Uhlik, O., M. Strejcek, P. Junkova, M. Sanda, M. Hroudova, C. Vlcek, M. Mackova and T. Macek (2011). "Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDI biotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil." Appl Environ Microbiol **77**(19): 6858-6866.

Anlagen:

- final report Phytfire
- step-by-step protocol MALDI sample and data analysis