

Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften
Molekulare Pflanzenphysiologie
Im Neuenheimer Feld 360
69120 Heidelberg

Forschungsprojekt Nr.: 06HS034

Thema: Wirkungsweise von Antagonisten gegen *Erwinia amylovora* und deren
Epidemiologie

Laufzeit: 01.03.2007 bis 31.08.2010

Projektleitung: Prof. Dr. Thomas Rausch

Projektbearbeitung: Dipl. Biol. Isabel Gehring

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Prof. Dr. W. Jelkmann, Julius Kühn-Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau,
Dossenheim

Prof. Dr. K. Geider, Julius Kühn-Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau,
Dossenheim

Dr. E. Moltmann, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg -
Außenstelle Stuttgart, Stuttgart.

Dr. M. Kube, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Die Bakterien *E. billingiae* und *E. tasmaniensis* sollen auf ihren Wirkungsgrad gegen *E. amylovora* und bezüglich ihrer Verbreitung und Kolonisierung von Pflanzenoberflächen untersucht werden. Isolate im europäischen bzw. deutschen Raum sollen isoliert und das Vorkommen und die Verbreitung dieser Bakterien auf symptomfreien und symptomatischen Blüten geklärt werden. Hierfür muss ein PCR System zum spezifischen Nachweis der Antagonisten etabliert werden. Weitere apathogene *Erwinia* Stämme sollen auf Bacteriocinbildung getestet werden. Eine Optimierung der Behandlung gegen Feuerbrand durch antagonistische Bakterien soll erreicht werden.

Die Hefestämme sollen auf eine Mehrberostung bei unterschiedlichen Sorten getestet werden.

1.1 Planung und Ablauf des Projekts

Während der Blütezeit sollen die Freilandversuche in Kirschgartshausen durchgeführt, antagonistische Bakterien von Blüten isoliert und klassifiziert und Berostungsversuche durchgeführt werden.

Außerhalb der Blütezeit sollen Klimakammer- und Laborversuche zur Charakterisierung neuer Isolate durchgeführt werden. Zusätzlich sollte die Formulierung und damit die Anwendungsvoraussetzungen für die Freilandversuche verbessert werden.

1.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand

In früheren Freilandversuchen in Kirschgartshausen konnte gezeigt werden, dass Antagonisten einen guten Wirkungsgrad gegen *E. amylovora* haben (Moltmann *et al.*, 2006). Die Antagonisten *E. tasmaniensis* (Geider *et al.*, 2006) und *E. billingiae* (Mergaert *et al.*, 1999) wurden schon in Labor- und Freilandversuchen getestet und zeigten vor allem in Laborversuchen einen sehr guten Wirkungsgrad (Jakovljevic *et al.*, 2008). Die Genomsequenz von *E. tasmaniensis* wurde in Kooperation mit Dr. Michael Kube ermittelt (Kube *et al.*, 2008) und stellte eine Informationsquelle für den Vergleich mit der vorläufigen Sequenz des *E. amylovora* Stammes Ea273 dar.

Für die Hefen wurden Freilandversuche mit guten Wirkungsgraden und erste Tests zur möglichen Mehrberostung durchgeführt, deren Ergebnisse zu bestätigen sind.

Bacteriocine werden von Bakterien produziert und haben meist eine Wirkung auf nah verwandte Bakterien. Aus diesem Grund sollen apathogene *Erwinia* Arten auf eine Bacteriocinbildung und gegebenenfalls eine Hemmung gegen *Erwinia amylovora* untersucht werden.

2. Material und Methoden

Spezifische Primer zur Differenzierung

Für eine Differenzierung der Erwinien wurden Sequenzanalysen der house keeping gene *recA* und *gpd* durchgeführt. An Hand der Sequenzen wurden spezifische Primer für *E. amylovora*, *E. tasmaniensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. rhapontici*, *E. psidii*, *E. mallotivora* und *E. pyrifoliae* kreiert. Die Primer basieren auf einzelnen Basenabweichungen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) und ermöglichen eine Differenzierung dieser Erwinien. Die Primer wurden für Populationsuntersuchungen, aber auch für die quantitative Auswertung von Laborversuchen mittels real time PCR verwendet.

Zusätzlich wurden Primer für *E. amylovora*, *E. tasmaniensis* und *E. billingiae* kreiert, denen Sequenzabschnitte mit nur geringer Homologie zwischen den Arten zu Grunde liegen, wie z.B. der Levansucrase oder dem *wbdN* Gen. Diese Primer wurden für die Untersuchung von Mischkulturen aus dem Freiland und Feuerbrandverdachtsproben verwendet.

Blütenversuche

Die Gewächshausblüten werden in mit Wasser gefüllte Reaktionsgefäße gestellt. Auf den Blütenboden werden 10 µl der zu untersuchenden Chemikalie bzw. des Antagonisten, nach dem Eintrocknen werden 10 µl *E. amylovora* Ea1/79Sm (streptomycinresistenter Stamm) auf den Blütenboden gegeben. Inkubation für 5 Tage bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 26°C/18°C. Auswertung erfolgt mittels Ausplattieren und Auszählung auf St1+Sm Platten und/oder mittels real time PCR. Die Antagonisten werden in einer Konzentration von 10⁹ cfu/ml und Ea1/79Sm von 5*10⁵ cfu/ml eingesetzt.

Birnenversuche

Die unreifen Birnen werden in 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in einer Lösung gebadet, die entweder die zu testenden Antagonisten oder Chemikalien

enthält. Die Scheiben werden für 10 Minuten gebadet, getrocknet und anschließend mit 10 µl Ea1/79Sm infiziert. Inkubation für 5 Tage bei 28°C und die Auswertung erfolgt visuell nach Symptomatik. Die Antagonisten werden in einer Konzentration von 10^9 cfu/10ml eingesetzt. Die Konzentration an Ea1/79Sm variiert zwischen $5 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^6$ cfu/ml je nach Versuchsansatz.

Suche nach apathogenen Erwinien mit Hemmwirkung gegen *E. amylovora*

Die zu testenden Bakterien werden auf St1 Platten gepickt und mit Softagar+Sm+Ea1/79 Sm überschichtet. Wenn die Bakterien eine Hemmwirkung gegen *E. amylovora* haben, wird dies durch einen Hemmhof um die zu testenden Bakterien sichtbar.

Tests mit Kulturüberständen bzw. Chemikalien wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnung von *E. amylovora* in St1 Medium in Mikrotiterplatten und die zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben und die optische Dichte bei 600nm zu mehreren Zeitpunkten gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Freilandversuche in Kirschgartshausen

2008 wurde *E. billingiae* Eb661 und *E. tasmaniensis* Et1/99 im Freiland getestet. Beide wurden für zwei Tage kultiviert und anschließend in Glycerin bei -80°C gelagert. Die Stämme waren beide $\sim 10^8$ cfu/ml. Eb661 erreichte einen Wirkungsgrad von 31,4%, Et1/99 von 67,9% und Streptomycin von 87,7%. Zusätzlich wurden noch Bäume beprobt, um die Antagonisten auf der Blüte nachzuweisen. Et1/99 konnte während des gesamten Versuches auf den Blüten nachgewiesen werden, wohingegen Eb661 nicht mehr reisoliert werden konnte. Auch weitere Klimakammerversuche zeigten, dass Eb661 keine stabile Population mit hoher Dichte auf den Blüten aufrechterhalten kann. Aus diesen Gründen wurde Eb661 nicht mehr im Freiland getestet.

2009 wurde Et1/99 in Zusammenarbeit mit der Firma ABITEP (Berlin) konserviert und das Trockenpulver im Freiland getestet. Laborversuche zeigten einen

guten Wirkungsgrad für organische Säuren und auf Grund dieser Ergebnisse wurde Propionsäure im Freiland als zweites Präparat getestet. Et1/99 erreichte einen Wirkungsgrad von 19,5%, Propionsäure 26,6% und Streptomycin 64,3%. Im Versuchsjahr 2009 waren die Wettervoraussetzungen schlecht, da es während der Blütezeit und auch nach den Applikationen sehr viel geregnet hat. Dies erschwerte eine Besiedelung der Blüten durch die Antagonisten und ist eine Erklärung für den schlechten Wirkungsgrad von Et1/99. Auch die Konservierung war noch nicht optimal, da wir einen starken Verlust des Titors im Trockenpulver feststellten. Auch alle anderen Versuchspräparate zeigten einen schlechten Wirkungsgrad in 2009.

2010 wurde ein deutscher *E. tasmaniensis* Stamm (EtDs08) getestet. Dieser Stamm zeigte in allen Laborversuchen sehr gute Wirkungsgrade und wurde über zwei Tage kultiviert und anschließend in Glycerin bei -80°C gelagert. Das zweite Versuchspräparat war eine Kombination von EtDs08 und Propionsäure, die als Gemisch ausgebracht wurde. Die Propionsäure wurde weiter in Laborversuchen getestet und zeigte in Kombination mit Antagonisten eine Steigerung des Wirkungsgrades. EtDs08 hatte einen Wirkungsgrad von 81,3%, EtDs08 + Propionsäure 83,9% und Streptomycin 95,1%. Die Kombination aus Antagonist und Propionsäure zeigte den besten Wirkungsgrad der getesteten Prüfmittel. Zusätzlich wurde ein Verbreitungs- und Besiedelungsversuch durchgeführt. Hierfür wurden zwei Bäume in einer Reihe mit EtDs08 besprüht und die benachbarten Bäume bzw. frisch geöffnete Blüten beprobt. Es konnte gezeigt werden, dass EtDs08 eine stabile Population auf der Blüte bildet und sich auf benachbarte Bäume bzw. frisch geöffnete Blüten ausbreitet. Der Nachweis von EtDs08 erfolgte nach der Reisolierung von der Blüte mit spezifischen Primern und PCR, die Quantifizierung mittels real time PCR.

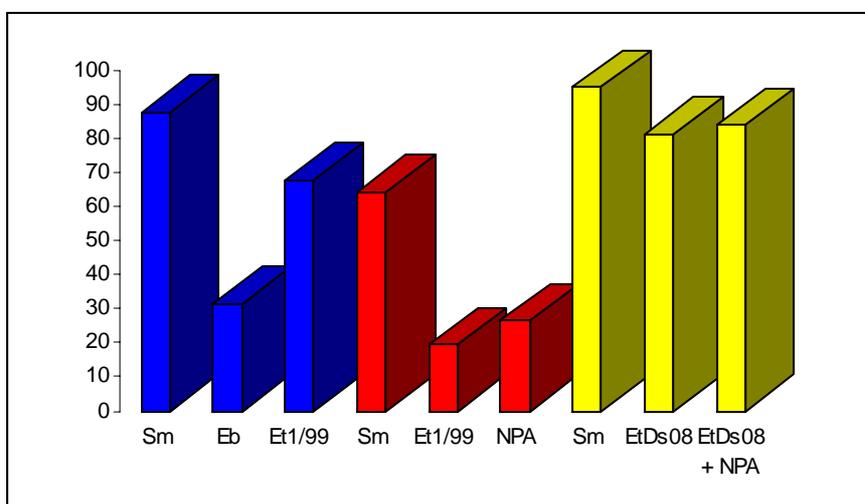


Abb.: Ergebnisse der Freilandversuche Kirschgartshausen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Jahren 2008 (blau), 2009 (rot) und 2010 (gelb).

Klassifizierung und Charakterisierung von Erwinien

Die spezifischen Primer der house keeping Gene *recA* und *gpd* wurden zur Klassifizierung von Freilandisolaten und für Populationsstudien verwendet. Mittels dieser Primer konnte 2008 ein deutscher *E. tasmaniensis* Stamm von symptomfreien Blüten in Dossenheim isoliert werden. *E. billingiae* konnte 2007-2010 von symptomfreien Blüten und aus Feuerbrandverdachtsmaterial isoliert werden. *E. billingiae* wird häufig in befallenem Holz als Begleitorganismus nachgewiesen. Auch *E. rhapontici* und *E. persicina* konnten isoliert werden. Die Mischkulturen aus dem Freiland und Feuerbrandverdachtsproben wurden auch mit weiteren spezifischen Primern für *E. amylovora*, *E. tasmaniensis* und *E. billingiae* aus der *lsc* und *pstS-glmS* Region untersucht.

Die Freilandisolate wurden nach ihrer Klassifizierung auf ihren Wirkungsgrad gegen *E. amylovora* getestet und verschiedene Sequenzanalysen durchgeführt. Die deutschen Isolate unterscheiden sich nicht von den Typstämmen in Bezug auf ihren Wirkungsgrad. Sequenzanalysen zeigten für *Erwinia billingiae* in den untersuchten Genabschnitten viele Basenabweichungen zwischen den Isolaten und zwischen dem Typstamm Eb661 und weiteren Isolaten aus England. Hingegen ist *E. tasmaniensis* auf Sequenzebene sehr konserviert in Bezug auf die untersuchten Gene, ermöglicht aber an Hand von SNPs eine Zuordnung zum Isolationsort. So ist eine Unterscheidung zwischen Stämmen aus Australien, Südafrika und Deutschland möglich. Nach der Sequenzierung von Et1/99 wurde auch Eb661 und das Birnenpathogen Ep1/96 in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Kube am MPI (Berlin) sequenziert und ermöglicht weitere Vergleiche zwischen den Pathogenen und den Antagonisten (Kube *et al.*, 2010). Auch von *E. amylovora* wurde die Sequenz eines amerikanischen und eines französischen Stammes veröffentlicht (Sebahia *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2010), was weitere Sequenzanalysen ermöglicht.

Apathogene Bakterien mit Wirkung gegen *E. amylovora*

Aus Feuerbrandverdachtsmaterial konnte ein Stamm isoliert werden, der eine direkte Wirkung auf das Wachstum von *E. amylovora* hat. Der Stamm BK1 konnte noch nicht klassifiziert werden, ist aber nahe verwandt mit *Serratia*. Auf Platten zeigt BK1 einen deutlichen Hemmhof und auch der Kulturüberstand von BK1 aus Minimalmedium hat einen guten Wirkungsgrad in Mikrotiter tests, bei Birnen- und Blütentests hat BK1 einen eher mittleren Wirkungsgrad verglichen mit *E.*

tasmaniensis. Aus dem Kulturüberstand von BK1 konnte eine der hemmenden Substanzen als Acetat identifiziert werden. Auf Grund dieses Ergebnisses wurden verschiedene organische Säuren getestet. Es zeigte sich, dass Propionsäure den besten Wirkungsgrad gegen *E. amylovora* hat. Die Säuren wurden in neutralisierter Form getestet, um eine Hemmung auf Grund des pH Effekts auszuschließen.

2010 konnten weitere Stämme von Blüten isoliert werden, die eine Hemmung gegen *E. amylovora* auf Platte zeigen. Die Hefe-Stämme konnten noch nicht klassifiziert werden. Erste Versuche deuten darauf hin, dass das Wirkprinzip nicht auf der Produktion von Säuren basiert. Die Bestimmung der Wirksubstanz bedarf noch weiterer Tests.

Birnen- und Blütentests

Die Ergebnisse aus Birnen- und Blütentests sind vergleichbar. Wenn die Epiphyten die Pflanzenoberfläche dicht besiedeln können, haben sie einen sehr guten Wirkungsgrad gegen *E. amylovora*. Da im Freilandversuch 2008 gezeigt werden konnte, dass *E. tasmaniensis* die Blüten im Freiland deutlich besser besiedeln kann als *E. billingiae* konzentrierten sich die Pflanzentests auf verschiedene *E. tasmaniensis* Isolate. Nach den Tests mit den organischen Säuren wurde an einer möglichen Kombination von *E. tasmaniensis* mit den Säuren gearbeitet. Es zeigte sich bei Mikrotiter-tests, dass *E. tasmaniensis*, im Vergleich zu *E. amylovora*, durch Propionsäure weniger im Wachstum gehemmt wird, was eine Kombination aus *E. tasmaniensis* und Propionsäure möglich macht. Es war auch möglich einen propionsäuretoleranten EtDs08 zu isolieren. Dieser ist in Vollmedium (LB oder StI) tolerant, nicht aber in Minimalmedien oder Wasser. Der Grund für die Toleranz bzw. den Verlust der Toleranz in Minimalmedien muss in weiteren Labortests geklärt werden.

Eine Kombination der Epiphyten mit Säuren zeigte eine Erhöhung der Wirkungsgrade. Es zeigte sich auch, dass EtDs08 auch in Labortests einen besseren Wirkungsgrad als Et1/99 hat, was sich auch im Freiland bestätigte. Durch Zugabe von Acetat konnten die Wirkungsgrade nur wenig erhöht werden, da Acetat selbst auch nur eine geringe Wirkung hat.

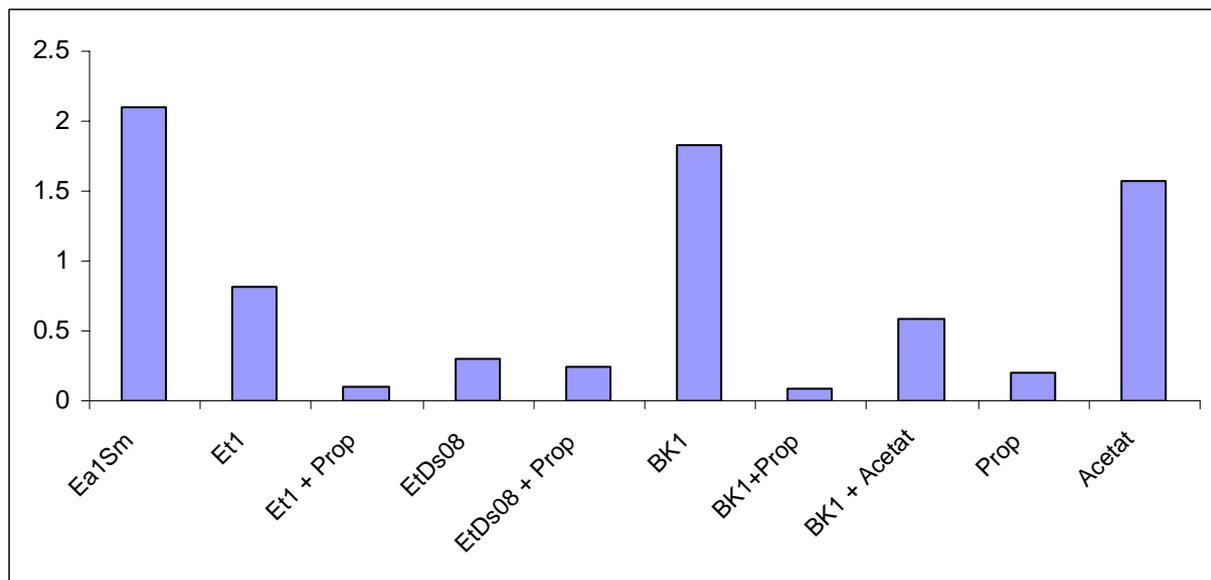


Abb.: Zusammengefasste Ergebnisse der Birnenversuche. Getestet wurden Epiphyten, organische Säuren und eine Kombination mit Propionsäure. Ausgewertet wurde mit einem Punktesystem, bei dem 3 Punkte einem deutlichen Befall von mehr als der Hälfte der Birnenscheibe, 2 Punkte einem deutlichen Befall von weniger als der Hälfte der Birnenscheibe, 1 Punkt einem leichten punktuellen Befall und 0 Punkte keinem Befall entsprachen.

Berostungsversuche mit Hefen

Bei den Versuchen zur Mehrberostung durch Hefen konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Laborversuche zeigten, dass *E. tasmaniensis* als Antagonist gegen Feuerbrand besser geeignet ist als *E. billingiae*. Es konnte auch gezeigt werden, dass *E. amylovora* sehr sensitiv gegenüber neutralisierten organischen Säuren ist. Eine Kombination aus Antagonist und neutralisierter organischer Säure führt zu einer leichten Verbesserung des Wirkungsgrades. Propionsäure hat sich hierbei als die Säure mit dem besten Wirkungsgrad und zusammen mit *E. tasmaniensis* als die beste Kombination herausgestellt. Dies konnte auch in den Freilandversuchen bestätigt werden, in dem 2010 die Kombination aus EtDs08 + Propionsäure das am Besten getestete Prüfmittel war. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass EtDs08 eine stabile Population auf den

Blüten bildet und sowohl frisch geöffnete Blüten besiedeln, als auch sich auf benachbarte Bäume ausbreiten kann. Gerade das Besiedeln neu geöffneter Blüten ist eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung eines Antagonisten, da die Blüten nach dem Öffnen fast steril und ungeschützt gegen ein Besiedeln von *E. amylovora* sind. Weitere Untersuchungen von EtDs08 und der Kombination mit Propionsäure in Freilandversuchen sind notwendig, um die vorhandenen Ergebnisse zu Bestätigen. Zur Verbesserung der Anwendbarkeit muss EtDs08 trockenkonserviert werden und um einen Titerverlust vergleichbar mit dem bei Et1/99 zu verhindern, sind weitere Tests nötig.

EtDs08 wurde von symptomfreien Blüten in Dossenheim isoliert und ist mit molekularbiologischen Methoden vom australischen Typstamm unterscheidbar. Er ist identisch mit einem weiteren deutschen Isolat aus dem Jahr 2003. Da es sich hierbei um einen einheimischen, apathogenen Stamm handelt ist eine Ausbringung in größerem Maßstab möglich. Auf Grund der vorhandenen Sequenzinformationen von Et1/99 kann auch auf Sequenzebene gezeigt werden, dass *E. tasmaniensis* wichtige Gene, wie z.B. für den Abbau von Sorbitol, im Vergleich zu *E. amylovora* fehlen.

4. Zusammenfassung

Für die Klassifizierung neuer epiphytischer Bakterien bzw. für Populationsuntersuchungen wurden Primer synthetisiert, die auf einer Differenzierung der Erwinien an Hand von SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) basieren. Hierfür wurden Sequenzanalysen durchgeführt und ein PCR Programm etabliert. Die Primer ermöglichen eine Unterscheidung von *E. amylovora*, *E. tasmaniensis*, *E. billingiae*, *E. persicina*, *E. rhapontici*, *E. psidii*, *E. mallotivora* und *E. pyrifoliae*. Die Primer können auch für real time PCR verwendet werden und ermöglichen somit eine Quantifizierung von Laborversuchen und Populationsstudien aus Freilandproben. Für die Untersuchung von Feuerbrandverdachtsproben und Mischkulturen aus dem Freiland wurden weitere Primer für PCR und real time PCR synthetisiert. Aus Feuerbrandverdachtsproben konnten im Projektzeitraum unterschiedliche *E. billingiae* Stämme isoliert werden, die häufig als Begleitorganismen in symptomatischem Holz auftreten. *E. tasmaniensis* konnte 2008 in Deutschland von Blüten isoliert werden und auf Grund verschiedener Sequenzanalysen als deutsches Isolat klassifiziert werden. Die deutschen Isolate

wurden in Labor- und Pflanzentests charakterisiert und zeigten vergleichbare Wirkungsgrade mit den Typstämmen. Genomvergleiche zwischen *E. amylovora*, *E. pyrifoliae*, *E. tasmaniensis* und *E. billingiae* zeigen das Fehlen von Virulenzfaktoren bei den Epiphyten.

E. tasmaniensis und *E. billingiae* zeigen in Laborversuchen eine sehr gute Wirkung gegen *E. amylovora*, in Freilandversuchen konnte dies nur für *E. tasmaniensis* bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass *E. tasmaniensis* eine stabile Population auf Blüten bildet und auch die Blüten benachbarter Bäume besiedelt. Vor allem das deutsche Isolat EtDs08 zeigte einen sehr guten Wirkungsgrad in Kirschgartshausen von 81,3%. Die Charakterisierung von apathogenen Bakterien mit Hemmwirkung gegen *E. amylovora* zeigte, dass der Stamm BK1 Acetat an seine Umgebung abgibt und hierauf die Hemmung zum Teil beruht. Aus diesem Grund wurden neutralisierte organische Säuren auf ihre Wirkung gegen *E. amylovora* getestet und es konnte gezeigt werden, dass Propionsäure in Labor- und Pflanzentests eine gute Wirkung hat. Auch im Freiland in Kirschgartshausen 2009 konnte dies bestätigt werden. Als Kombinationsansatz wurde die Wirkung der Säuren auf die Epiphyten getestet und eine Kombination aus *E. tasmaniensis* EtDs08 und Propionsäure zeigte in Labortests die besten Wirkungsgrade und wurde 2010 im Freilandversuch getestet. Diese Kombination hatte 2010 den besten Wirkungsgrad der getesteten Prüfmittel. Desweiteren wurden die Stämme C1, C4 und C6 auf ihre Hemmwirkung untersucht. Es handelt sich hierbei um *Rhanella* Stämme, die eine direkte Wirkung gegen *E. amylovora* haben. Die Stämme wurden von symptomfreien Blüten isoliert.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Es konnten spezifische Primer und ein PCR Programm etabliert werden, die eine Klassifizierung von Erwinien ermöglichen. Mit diesen und weiteren etablierten Primern konnten die Populationsstudien durchgeführt und neue deutsche und europäische Isolate isoliert werden. Eine Charakterisierung dieser Isolate erfolgte in Labor- und Pflanzentests. Es konnte im Fall von EtDs08 mittels Sequenzanalysen gezeigt werden, dass es sich um einen deutschen Stamm handelt, dessen Wirkung in Labortests, aber auch im Freiland vergleichbar ist, mit dem bisher verwendeten

Typstamm Et1/99. Durch die Kombination mit Propionsäure konnte der Wirkungsgrad nochmals verbessert werden. Eine Trockenkonservierung zur besseren Anwendung im Freiland bedarf weiterer Tests und der Kooperation mit einer hierauf spezialisierten Firma.

Es konnten Bakterien isoliert werden, die eine Hemmung gegen *E. amylovora* in Labortests haben. Im Falle von BK1 konnte Acetat als eine der Wirksubstanzen identifiziert werden und eine Kombination von Antagonisten und organischen Säuren wurden auf Grund dieser Ergebnisse getestet und führte zu einer leichten Steigerung der Wirkungsgrade der Epiphyten. Des weiteren wurden die Stämme C1, C4 und C6 von symptomfreien Blüten isoliert. Bei diesen Stämmen handelt es sich um *Rhanella* Stämme, die eine direkte Wachstumshemmung gegen *E. amylovora* haben. Weitere Hefestämme mit Wirkung gegen *E. amylovora* wurden 2010 isoliert, deren Wirkprinzip und Taxonomie noch nicht geklärt werden konnte.

Mit den Hefen wurden Berostungsversuche durchgeführt, die keine signifikante Mehrberostung zeigten.

Dipl. Biol. Isabel Gehring
JKI Dossenheim und
Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften
INF 360
69120 Heidelberg

6. Literaturverzeichnis

- Geider, K., G. Auling, Z. Du, V. Jakovljevic, S. Jock and B. Volksch (2006). "Erwinia tasmaniensis sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 12): 2937-2943.
- Jakovljevic, V., S. Jock, D. Zhiqiang and K. Geider (2008). "Hypersensitive response and acyl-homoserine lactone production of the fire blight antagonists *Erwinia tasmaniensis* and *Erwinia billingiae*." Microbial Biotechnology **1**(5): 416-424.
- Kube, M., A. M. Migdoll, I. Gehring, K. Heitmann, Y. Mayer, H. Kuhl, F. Knaust, K. Geider and R. Reinhardt (2010). "Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*." BMC Genomics **11**(1): 393.
- Kube, M., A. M. Migdoll, I. Muller, H. Kuhl, A. Beck, R. Reinhardt and K. Geider (2008). "The genome of *Erwinia tasmaniensis* strain Et1/99, a non-pathogenic bacterium in the genus *Erwinia*." Environ Microbiol **10**(9): 2211-2222.
- Mergaert, J., L. Hauben, M. C. Cnockaert and J. Swings (1999). "Reclassification of non-pigmented *Erwinia herbicola* strains from trees as *Erwinia billingiae* sp. nov." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 2**: 377-383.
- Moltmann, E., A. Fried, A. Seibold and E. Lange (2006). "More results of testing control agents for fire blight in the field with a new experimental design." Acta Hort. (ISHS) **704**: 253-258.
- Sebahia, M., A. M. Bocsanczy, B. S. Biehl, M. A. Quail, N. T. Perna, J. D. Glasner, G. A. DeClerck, S. Cartinhour, D. J. Schneider, S. D. Bentley, J. Parkhill and S. V. Beer (2010). "Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946." Journal of Bacteriology **192**(7): 2020-2021.
- Smits, T. H., F. Rezzonico, T. Kamber, J. Blom, A. Goesmann, J. E. Frey and B. Duffy (2010). "Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia spp.*" Mol Plant Microbe Interact **23**(4): 384-393.