

Abschlussbericht August 2010

Zuwendungsempfänger

Institut für Botanik
Leibniz Universität Hannover
Herrenhäuserstr. 2
30419 Hannover

PD. Dr. rer. nat. Achim Gau
email: achim.gau@botanik.uni-hannover.de
Telefon: 0511-7625540; Fax 0511-7623992

Forschungsvorhabensnummer

Förderkennzeichen: 06HS035, Bekämpfung des Feuerbranderreger im Obstbau ohne Antibiotika

Titel des Projektes

„Identifizierung der Wirkmechanismen von mikrobiellen Feuerbrandantagonisten von *Erwinia amylovora*„

Laufzeit

01.04. 2007 – 31.08. 2010

Berichtszeitraum

01.04. 2007 – 31.08. 2010

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Das eingereichte Forschungsprojekt hatte zum Ziel, die von den mikrobiellen Feuerbrandantagonisten *Aureobasidium pullulans* CF10 und CF40 sowie *Pseudomonas fluorescens* A506 und Bk3 sezernierten Wirkkomponenten zu identifizieren und ihre direkte Wirkung gegenüber dem Feuerbranderreger *E. amylovora* *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren. Die Wirksamkeit dieser Komponenten konnte durch ein neues Meßsystem durch Nutzung eines autolumineszenten *E. amylovora* 222 Stammes direkt geschehen. Als übergeordnetes Ziel sollten auf diesem Weg Komponenten detektiert werden, die für einen Einsatz als Pflanzenschutz- oder Pflanzenstärkungsmittel geeignet sein könnten und somit die Applikation von Antibiotika im Erwerbsobstbau substituieren.

1.1 Ursprüngliche Planung und Ablauf des Vorhabens

1.	Direkte Charakterisierung der Wirksamkeit der mikrobiellen Antagonisten (<i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3, <i>Aureobasidium pullulans</i> CF 10 bzw. CF40) gegenüber <i>E. amylovora</i> durch Messung von Biolumineszenz am <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE Stamm	3 Monate
2.	Charakterisierung der Wirksamkeit der extrazellulären Proteinfractionen dieser Mikroorganismen gegenüber <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE	3 Monate
3.	Analyse dieser Proteinfractionen in der 2D-Gelelektrophorese	3 Monate
4.	Aufreinigung der Wirkkomponenten (Ionenaustauschchromatographie oder HPLC)	12 Monate
5.	Identifizierung der Wirkkomponenten durch Massenspektrometrie/ Proteinsequenzierung	3 Monate
6.	Klonierung, Überexpression und Reinigung der korrespondierenden Genprodukte	6 Monate
7.	Evaluierung der Wirksamkeit der identifizierten Komponenten im direkten Test durch Messung der Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE oder unter Klimakammerbedingungen (S1) auf Feuerbrand-infizierten Pflanzen	6 Monate
	Gesamtdauer	36 Monate

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Infektion von *Pomoideae* wie Apfel- und Birnenbäume (*Malus* und *Pyrus*), Quitte (*Cydonia*), Himbeere (*Rubus*) und zahlreiche anderen Nutz- und Zierpflanzen wie zum Beispiel Feuerdorn-Arten (*Pyracantha*), Weißdorn (*Crataegus*) und Mispeln (*Cotoneaster*) mit dem Bakterium *Erwinia amylovora* führt zur Krankheit Feuerbrand und damit zu einer der schwerwiegendsten Erkrankungen im Erwerbsobstbau (Eastgate, 2000; Oh und Beer, 2005). Feuerbrand ist eine meldepflichtige Krankheit, die erstmalig 1780 in Hudson Valley in New York beobachtet worden ist. Erst 1880 konnte festgelegt werden, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine Bakteriose handelt. Bis 1990 hatte sich die Krankheit von ihrem

ursprünglichen Entdeckungsort bis nach Ontario, Kanada, Kalifornien, Oregon und Washington ausgebreitet. In England wurde Feuerbrand 1957 erstmalig nachgewiesen. Inzwischen hat sich Feuerbrand rapide in zahlreichen weiteren europäischen Ländern ausgebreitet. In Deutschland wurde Feuerbrand erstmalig 1971 in Schleswig-Holstein beobachtet, in Österreich trat die Erkrankung erstmalig 1996 im Vorarlberg auf (van der Zwet, 2002).

E. amylovora verursacht Ernteausfälle, die ökonomisch bedeutsam sind. Bei Befall von Obstplantagen kann es zu Ertragsverlusten zwischen 35% und 100% kommen. (Bericht über die Feuerbrandsituation, 2003-2008).

Die Kontrolle von Feuerbrand umfasst verschiedene Maßnahmen. Hierzu gehören die mechanische Bekämpfung durch Reduktion des Inokulums, die Kontrolle Feuerbrandverbreitender Insekten, Vorhersagemodelle zur Prognose der Erkrankung, die Anwendung von Antibiotika, der Einsatz resistenter Apfel- oder Birnenkultivare sowie als Alternative die biologische Bekämpfung von Feuerbrand.

Die erfolgreichste Bekämpfung von Feuerbrand erfolgt präventiv durch den Einsatz von Streptomycin und Oxytetracyclin. Zwar steht auch das Pflanzenschutzmittel Regalis (Wirkstoff Prohexadione-Ca) zur Verfügung, das aber nicht für die Anwendung auf Blüten geeignet ist. (Agrios, 2005, Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Auch kupferhaltige Pflanzenschutzmittel können bei präventivem Einsatz gegen Feuerbrand wirksam sein; diese hemmen das Wachstum des Feuerbranderregers vor allem unter Aminosäure-Mangelbedingungen und wirken sich inhibitorisch auf enzymatische Aktivitäten aus, töten *E. amylovora* aber nicht ab. Ein kupferhaltiges Pflanzenschutzmittel gegen Feuerbrand ist in Deutschland zurzeit nicht zugelassen (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008, Geider, 1999).

Streptomycin und Oxytetracyclin werden in den USA bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts gegen *E. amylovora* eingesetzt (McManus et al., 2002).

Die Antibiotika können einer Feuerbrand-Infektion um bis zu 90% entgegenwirken, ein großes Problem ist aber das zunehmende Auftreten Streptomycin-resistenter Stämme. Diese wurden bereits im westlichen Nord-Amerika sowie in Michigan, aber beispielsweise auch schon in Israel, Kanada, Neuseeland und im Libanon beobachtet (Johnson und Stockwell, 1998; McManus et al., 2002; Norelli et al., 2003).

In Deutschland gibt es kein zugelassenes Streptomycin-haltiges Pflanzenschutzmittel. Bei „Gefahr im Verzug“ dürfen allerdings Streptomycin-haltige Pflanzenschutzmittel wie „Plantomycin“, „Strepto“ oder „Firewall 17 WP“ mit gesonderter Genehmigung, in begrenztem Umfang und nur über eine Dauer von 120 Tagen angewendet werden. (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Auf Grund von nur eingeschränkten Möglichkeiten bei der Bekämpfung von *E. amylovora* und der Problematiken beim Einsatz von Antibiotika besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung des Feuerbranderregers; denkbar ist hier der Einsatz von nicht-pathogenen, mikrobiellen Antagonisten, die Wachstum und Ausbreitung des Feuerbranderregers auf Wirtspflanzen verhindern können.

Im Fokus dieser Untersuchungen sollten unter anderem die *P. fluorescens*-Stämme A506 und Bk3 stehen.

Verschiedene *P. fluorescens*-Stämme wurden bereits als Antagonisten phytopathogener Mikroorganismen identifiziert und ihre inhibitorische Wirkung konnte verschiedenen Mechanismen wie der Produktion von Antibiotika, Cyanwasserstoff oder Siderophoren, die

typisch für Pseudomonaden sind, zugeordnet werden (u.a. Haas und Défago, 2005; Kavitha et al., 2005; Madigan und Martinko, 2009; Maurhofer et al., 1994; Velusamy und Gnanamanickam, 2003).

P. fluorescens A506 ist einer der bekanntesten Feuerbrand-Antagonisten, der in den USA unter dem Namen Blight Ban® A506 kommerziell zur Bekämpfung von Feuerbrand eingesetzt wird. Ursprünglich wurde dieses Bakterium von einem gesunden Birnenbaum in einer Obstplantage in der Nähe von Healdsburg, CA isoliert. Der Antagonist kann bei geeigneter Applikation die Feuerbrand-Symptomatik bis zu 80% verhindern. In früheren Arbeiten wurde zunächst davon ausgegangen, dass *P. fluorescens* A506 ausschließlich über eine Wachstumskonkurrenz zur Unterdrückung von *E. amylovora* führt, neuere Studien zeigten aber auf, dass der Antagonist unter Eisen-supplementierenden Bedingungen möglicherweise ein Antibiotikum produziert, das sich toxisch auf den Feuerbranderreger auswirkt (Johnson und Stockwell, 1998; Temple et al., 2004; Wilson und Lindow, 1992).

Ein anderer *P. fluorescens*-Stamm Bk3 konnte zuerst als direkter Antagonist von *V. inaequalis*, dem Apfelschorferreger, herausgestellt werden. Weitere Arbeiten zeigten, dass *P. fluorescens* Bk3 zum einen *V. inaequalis* auch unter Freilandbedingungen kontrollieren, zum anderen aber auch bei der Wirtspflanze *M. domestica* cv. Holsteiner Cox die Pflanzen-eigene Abwehr von Pathogenen und damit die Produktion von PRs auslösen kann. Die PRs konnten bei *M. domestica* cv. Holsteiner Cox sowohl auf Transkriptom- und Proteomebene nachgewiesen werden; hierbei handelt es sich um eine β -1,3-Glucanase, eine Chitinase, ein Thaumatin-ähnliches Protein, ein Hevein (PR4) und ein Ribonuklease-ähnliches Protein (PR10 b) (Fiss, 2001; Kürkcüoğlu et al., 2004, Kürkcüoğlu, 2006).

Diese Ergebnisse deuten an, dass das nicht-pathogene Bakterium *P. fluorescens* Bk3 in *M. domestica* cv. Holsteiner Cox die Hochregulation von Transkripten für bekannte PR- Proteine und für Proteine mit einer Funktion in der Stress-Reduzierung bewirkt. Die Hochregulation dieser Proteine konnte im Vorfeld auch bei Infektion von *M. domestica* cv. Elstar (pathogen-suszeptibel) mit dem Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* beobachtet werden.

Somit kann geschlossen werden, dass der nicht-pathogene *P. fluorescens* Bk3 Stamm zumindest einen Teil von Transkripten hoch reguliert, die auch durch Pathogene hoch reguliert werden (Gau et al., 2004; Kürkcüoğlu et al., 2005, Kürkcüoğlu et al., 2006).

Tab. 1 Zusammenstellung von identifizierten Apoplasten-Proteinen (Gau et al., 2004; Kürkcüoğlu et al., 2005, Kürkcüoğlu et al., 2006).

	β -1,3- Glucanase	Thaumatin-ähnliches Protein	Chitinase	Cystein-Protease	Osmotin-like Protein	PR1-Protein
cv. Elstar (Pathogen-suszeptibel)	-	-	-	-	-	-
cv. Holsteiner Cox (Pathogen-suszeptibel) nach Behandlung mit <i>P. fluorescens</i> Bk3	+	+	+	-	-	-
cv. Elstar nach Infektion mit dem Pathogen <i>V. inaequalis</i>	+	+	+	+	-	-

Eine nähere Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraction von *P. fluorescens* Bk3 konnte mehrere Proteine identifizieren, die einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Konidienkeimung von *V. inaequalis* zeigten. Der stärkste Effekt konnte hierbei für eine extrazelluläre Protease und ein Peptidoglycan-assoziiertes Lipoprotein nachgewiesen werden (Hossain et al., 2009). Inwieweit diese Proteine im Zusammenhang mit einer Hemmung des Feuerbranderregers stehen können, ist bislang ungeklärt.

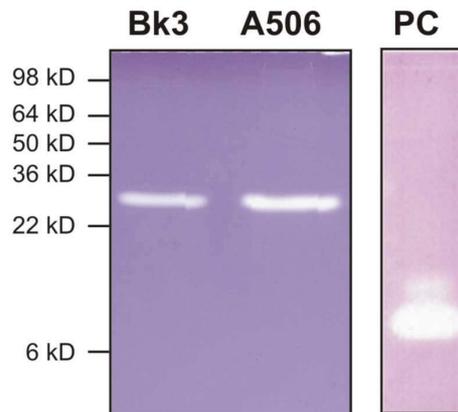


Abb. 1 Nachweis von proteolytischen Enzymaktivitäten extrazellulärer Proteine von *P. fluorescens* Bk3 und *P. fluorescens* A506 nach SDS-PAGE, Re-Isolierung Renaturierung im Casein-Aktivitätstest. Jede Spur wurde mit 5 µg Protein beladen. Hydrolytische Aktivität ist durch Nicht-Färbung angezeigt. **Bk3**: *P. fluorescens* Bk3, **A506**: *P. fluorescens* A506, **PC**: Positive Kontrolle mit Trypsin (1 µg).

Die Visualisierung und Bewertung inhibitorischer bzw. antagonistischer Effekte auf *E. amylovora* findet meistens durch die Durchführung von Freiland- oder Blütenversuchen, Dual Culture Tests oder Hemmhofversuchen statt. Häufig wird hierbei auf die Ausbildung lytischer Zonen hin untersucht, teilungsfähige Zellen erfasst oder die Symptomentwicklung auf Blüten, Blättern oder Zweigen beobachtet (z. B. Cabrefiga et al., 2007; Johnsson und Stockwell, 1997; Kunz, 2004; Kunz und Haug, 2006; Temple et al., 2004).

Um Wirkweisen von Antagonisten auf den Feuerbranderreger sensitiver nachweisen zu können, wurde im Rahmen von Vorarbeiten das Pathogen *E. amylovora* 222 (*E. amylovora* 222::TnluxCDABE) mit Luciferasereportergenen markiert, was eine nicht-invasive Detektion dieser Bakterien in echt-Zeit auf der Blattoberfläche und in der Pflanze durch Biolumineszenzmessung mit CCD (charge-coupled device)-Kameras ermöglichte. Durch die Verwendung des *lux*-Operons CDABE konnte zudem auf die metabolischen Aktivitäten der Mikroorganismen geschlossen werden, da zur Erzeugung der Biolumineszenz das zelleigene FMNH₂ benötigt wird, das nur in metabolisch aktiven Zellen gebildet wird.

Bei gleichzeitiger Applikation mit gleicher Zellzahl (1×10^7 Zellen) von Pathogen und *P. fluorescens* Bk3 auf eine Petrischale mit LB-Agar ist eine deutliche Verminderung der metabolischen Aktivität des Pathogens innerhalb von 48 Stunden auf ein fast nicht nachzuweisendes Niveau (> 95% Reduzierung) zu beobachten (siehe Abb. 2). Bei Durchführung dieses Versuchansatzes mit dem in den USA als Pflanzenschutzmittel zugelassenen Stamm *P. fluorescens* A506 konnte eine vergleichbare Inhibierung gemessen werden (Schmooch, 2006).

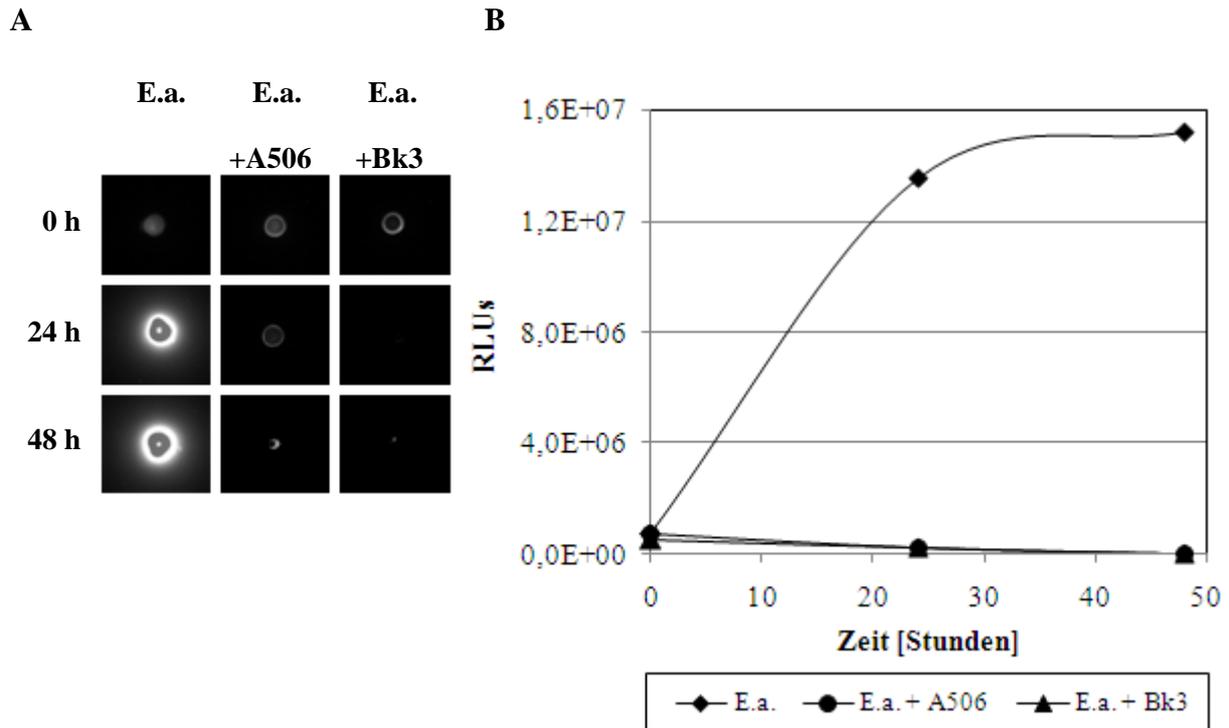


Abb. 2 A Messung der Biolumineszenz bei Co-Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E.a.) und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506/Bk3). Jeweils 1×10^7 Zellen von Pathogen und Antagonist wurden punktförmig in einem Endvolumen von $10 \mu\text{l}$ (in LB-Medium) auf LB-Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden. (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4). **B** Quantifizierung der gemessenen Biolumineszenz bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die Quantifizierung und Auswertung der gemessenen Biolumineszenz erfolgte mit IPLab und Excel 2000.

Die antagonistische Wirkung von *P. fluorescens* Bk3 gegenüber *E. amylovora* auf Pathogen-suszeptiblen *M. domestica* Kultivaren wurde mit sterilen, genetisch identischen *in vitro* Kulturen überprüft. Die Kontrollpflanzen (*M. domestica* cv. Holsteiner Cox) wurden mit dem autolumineszenten *E. amylovora* 222::TnluxCDABE Stamm infiziert und über einen Zeitraum von sechs Tagen mit einer hochsensitiven CCD-Kamera beobachtet. In Abb. 3 kann die deutliche Ausbreitung des Pathogens vor allem entlang der Blattadern über die Pflanze beobachtet werden. Bei einer Vorbehandlung von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit 1×10^9 Zellen von *P. fluorescens* Bk3 (zwei Tage vor Applikation des Pathogens) und nachfolgender Infektion mit dem Feuerbranderreger ist nur am Tag der Infektion eine Biolumineszenz zu beobachten. An den nachfolgenden Tagen findet keine Ausbreitung des Pathogens statt. Auch nach Beendigung des Experiments angefertigte Blattabdrücke führten zu keinem Nachweis des Feuerbranderreger (nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden kann, dass *P. fluorescens* Bk3 zu einer vollständigen Inhibierung des Pathogens geführt hat (Schmoock, 2006).

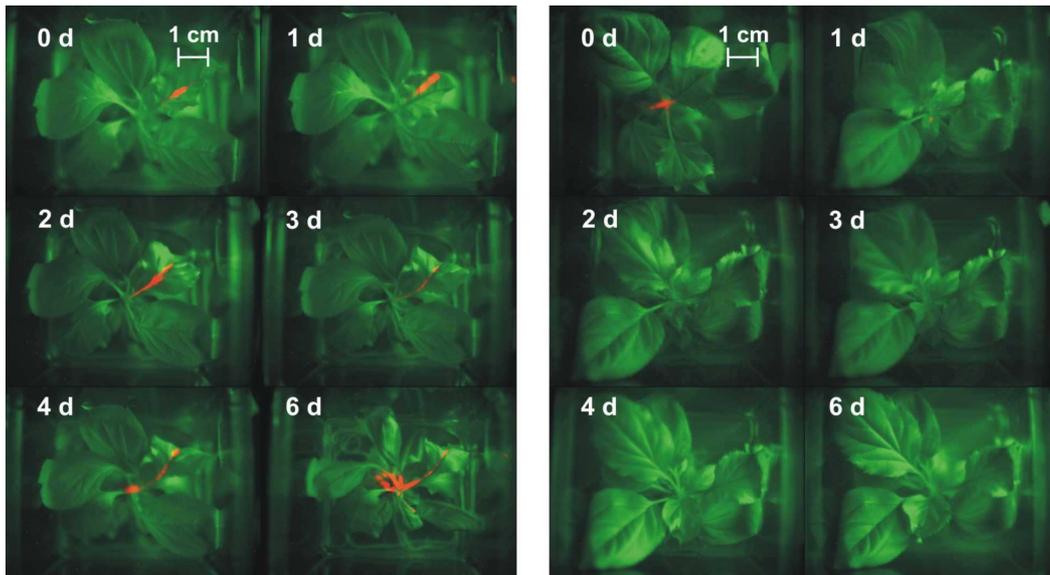


Abb. 3 Beobachtung der Ausbreitung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf *M. domestica* cv. Holsteiner Cox. **Links:** Infektion von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit 5×10^6 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. **Rechts:** Infektion von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox mit 5×10^6 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zwei Tage nach Vorbehandlung mit 1×10^9 Zellen von *P. fluorescens* Bk3. Jedes Bild besteht aus der Überlagerung des Lichtbildes (grün) und des Biolumineszenz-Bildes (rot) (Schmooch, 2006).

Weitere Antagonisten, die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens untersucht werden sollten, waren die *A. pullulans*-Stämme CF10 und CF40. *A. pullulans*-Stämme kommen weltweit vor und sind auch als „schwarze Hefe“ bekannt, da sie in der Lage sind, Melanin zu produzieren. Sie produzieren verschiedene Komponenten, dazu gehören Pullulan, ein extrazelluläres Polysaccharid, Siderophore (häufig Ornithin- oder Hydroxamsäure-Derivate) sowie verschiedene hydrolytische Enzyme wie Proteinasen, Lipasen, Zellulasen, Xylanasen, Mannanasen und Transferasen. Gleichzeitig haben diese Stämme eine hohe Toleranz gegenüber Austrocknung und Strahlung, womit sie generell gute Voraussetzungen für den Einsatz als Antagonisten im Freiland haben (Chi et al., 2009).

A. pullulans CF10 und CF40 werden als Formulierung von der Firma Bio-Protect als BlossomProtect fb angeboten; der Einsatz dieser Formulierung als Pflanzenstärkungsmittel ist in Deutschland gestattet (Feuerbrand-Strategiepapier 2008 bis 2012, 2008).

Blüten- und Feldversuche sowie Co-Kultur in Flüssigmedium zeigten vielversprechende Ergebnisse; unter Einsatz der Hefen konnten Feuerbrand-Befallsreduktionen bis zu 78% beobachtet werden, sowie eine vollständige Inhibierung von *E. amylovora* in Flüssigkultur. Neben beiden Hefestämmen enthält die Formulierung einen starken Puffer, der den pH auf 4,0 hält. Zusätzlich sind die Hefen in der Lage, ebenso Kulturmedien anzusäuern. *E. amylovora* kann bei einem derart sauren pH nicht wachsen. Es wird vermutet, dass der Wirkmechanismus der Hefen demnach auf eine Ansäuerung der Umgebung zurückzuführen ist (Kunz, 2004, Kunz, 2005, Kunz und Haug, 2006, Seibold et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit soll näher untersucht werden, ob *A. pullulans* CF10 und CF40 tatsächlich nur durch Ansäuerungsprozesse den Feuerbranderreger hemmen, oder noch andere Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

2. Material und Methoden

2.1 Generierung biolumineszenter *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* und Evaluierung der inhibitorischen Wirkung von *P. fluorescens* A506 und Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 und CF40 in Dual Culture Tests

2.1.1 Generierung biolumineszenter *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* und Messung von Biolumineszenz

Die Generierung autolumineszenter *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* erfolgte ursprünglich durch Transformation des Plasmids pRL1406 via Elektroporation auf elektrokompente *E. amylovora* 222. pRL27 wurde freundlicherweise von Prof. C. P. Wolk, MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 15 kb und trägt eine Kanamycin- und Spectinomycin-Resistenz. Es trägt zusätzlich das gesamte promotorlose *lux*-Operon mit den Genen *luxCDABE*. Das Operon kann durch ein Tn5-Minitransposon zusammen mit dem Gen für die Kanamycin-Resistenz ins Genom seiner Wirtszelle integriert werden. Nach Integration sind die Wirtszellen autolumineszent und Kanamycin-resistent, sofern das Operon hinter einem Promotor eines konstitutiv und stark exprimierten Gens in das Genom integriert wurde.

Die Biolumineszenz der transformierten Bakterien auf einer Kulturplatte wird mittels einer auf -35°C gekühlten hochsensitiven CCD-Kamera in einer Dunkelkammer gemessen.

Bei der hier verwendeten Kamera handelt es sich um eine Quantix (Photometrics) mit einem vorderilluminierendem Kodak KAF 1401E Chip, gekoppelt an ein Schneider/Kreuznach Xenon 0,015/17 mm Objektiv. Die Kamera dient zur Aufnahme von Aufsichtsbildern und wird über das Programm Lightview32 (Photometrics) auf einem Windows-NT-Computer kontrolliert.

Von Platten mit Bakterienkulturen wird zunächst ein Lichtbild aufgenommen (Belichtungszeit: 1 ms, Gain: 3, Binning: 4 x 4). Anschließend wird das Autolumineszenzbild, abhängig von der Stärke der Lumineszenz, mit einer Belichtungszeit zwischen 5 Sekunden und 2 Minuten (Gain: 3, Binning: 4 x 4) gemessen. Die Bilder werden mit IP-Lab 3.06 (Scanalytic), Corel Photo Paint 10.0 und Corel Draw 10.0 bearbeitet.

2.1.2 Durchführung von Dual Culture Tests

P. fluorescens A506 bzw. *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* werden über Nacht in LB-Medium, *A. pullulans* CF10 und CF40 in PD-Medium angezogen. Die Inkubationstemperatur beträgt 28°C.

Je 1 x 10⁷ Zellen von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* werden anschließend mit jeweils 1 x 10⁷ Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vermischt und in einem Endvolumen von 10 µl auf LB-Agarplatten punktförmig aufgetragen.

Genauso werden 1 x 10⁷ Zellen von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* mit jeweils 1 x 10⁷ Zellen von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 vermischt und in einem Endvolumen von 10 µl auf PD (pH 5,6, gepuffert)-, NBS (pH 5,8, ungepuffert)- oder NBSP (pH 7,0, gepuffert)-Agarplatten punktförmig aufgetragen.

Als Kontrolle werden die einzelnen Bakterienstämme in entsprechender Zellzahl ohne Antagonisten auf die genannten Agarplatten in einem Endvolumen von 10 µl punktförmig aufgetragen. Die Platten werden bei 28°C inkubiert und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet.

2.2 Durchführung von Hemmhofversuchen auf Minimalagar

Zusätzlich zu Dual Culture- und Vorinkubationsversuchen werden Hemmhofversuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob *P. fluorescens* A506 und Bk3 direkt inhibitorisch wirksame Komponenten sekretieren, die zu einer Hemmhofbildung auf einem Minimalagar für *E. amylovora* führen können.

Der Minimalagar hat dabei folgende Zusammensetzung:

1,5 g/L L-Asparagin, 26 mM KH_2PO_4 , 9 mM K_2HPO_4 , 0,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 8 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM Natriumcitrat, 10 g/L Agar.

Alle Komponenten werden in ca. 950 ml destilliertem Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C werden 111 mM Glukose, 2 mM Nicotinsäure und 0,6 mM Thiamin-Hydrochlorid (gelöst in ca. 50 ml destilliertem Wasser, steriltfiltriert) zugegeben.

Übernachtskulturen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium) werden 1:3 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt und jeweils 100 µl (entspricht ca. 9×10^7 Zellen) auf Minimalagarplatten ausplattiert.

Jeweils 15 µl der Übernachtskulturen (in LB-Medium) von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (entspricht ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen) werden mittig punktförmig auf die Agarplatten pipettiert und die Platten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Versuchsansätze werden auf eine Ausbildung eines Hemmhofes hin beobachtet und für einige Ansätze die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE an drei aufeinander folgenden Tagen gemessen (siehe 2.1.1).

2.3 Transposon-Mutagenese von *P. fluorescens* A506 und Bk3 und Charakterisierung der erzeugten Mutanten mit herabgesetzter inhibitorischer Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE

Um nach Möglichkeit Gene von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 identifizieren zu können, deren Produkte direkt oder indirekt in den Antagonismus gegenüber dem Feuerbranderreger involviert sind, wird mit beiden Stämmen eine Transposon-vermittelte Mutagenese durchgeführt, bei der per Zufallsprinzip Gene unterbrochen werden. Diese Mutanten sollten im Dual Culture Test eine herabgesetzte inhibitorische Wirkung gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigen. Zusätzlich sollen diese Mutanten durch Hemmhoftests, Untersuchung ihrer extrazellulären Proteinzusammensetzung mittels 2D-Gelelektrophorese sowie Aufnahme von Wachstumskurven näher charakterisiert werden.

2.3.1 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und Screening der Mutanten

Die Mutagenese von *P. fluorescens* A506 erfolgt mit dem Vektor pUT (Unge et al., 1999), der via Elektroporation auf das Bakterium übertragen wird. Die Mutagenese von *P. fluorescens* Bk3 erfolgt mit Vektor pRL27, der über Konjugation (durchgeführt nach Larssen et al., 2002) mit dem Donor-Stamm *E. coli* DH5αλ-pir auf *P. fluorescens* Bk3 übertragen wird. Beide Plasmide tragen das Gen für eine Transposase, die das ebenfalls Plasmid-kodierte *nptII*-Gen (Kanamycin-Resistenz) über ein Tn5-Transposon per Zufall ins Genom des Wirtsorganismus integriert. Bei erfolgreicher Transformation sind die Mutanten Kanamycin-resistent. Generierte Mutanten werden auf LB-Agar (mit 50 µg/ml Kanamycin) vereinzelt.

Das Screenen der Mutanten erfolgt in drei Etappen:

Etappe eins:

Die vereinzelt *P. fluorescens* A506- bzw. Bk3-Mutanten werden gepickt, auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und mit 5 µl einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium) bedeckt. Mutanten, die nicht in der Lage sind, die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von zwei Tagen komplett zu unterdrücken (Biolumineszenzmessung siehe 2.1.1), werden in Etappe zwei nachgescreent.

Etappe zwei:

Jeweils 5 µl von Übernachtskulturen vorselektierter Mutanten aus Etappe eins werden mit 5 µl einer Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium) vermischt und punktförmig auf LB-Agarplatten (mit 50 µg/ml Kanamycin) aufgetragen. Mutanten, die nicht in der Lage sind, die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von zwei Tagen vollständig zu unterdrücken (Biolumineszenzmessung siehe 2.1.1), werden in Etappe drei unter Einsatz gleicher Zellzahlen nachgescreent.

Etappe drei:

Etappe drei entspricht in der Durchführung der in 2.1.2 aufgeführten Methodik unter Einsatz gleicher Zellzahlen von Pathogen und Antagonist.

Hemmhoftests mit den Mutanten werden wie unter 2.4 beschrieben durchgeführt.

2.3.2 Charakterisierung der extrazellulären Proteinzusammensetzung der Mutanten mit 2D-Gelelektrophorese

Die Anzucht der Mutanten zur Gewinnung von Wachstumsüberständen erfolgt wie unter 2.4.1 beschrieben. Die 2D-Gelelektrophorese wird wie unter 2.5.2 beschrieben durchgeführt und die extrazelluläre Proteinzusammensetzung mit der der Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verglichen.

2.3.3 Aufnahme von Wachstumskurven mit den generierten Mutanten

Die Wachstumseffizienz der generierten *P. fluorescens* A506- bzw. Bk3-Mutanten wird mit dem Wachstum der jeweiligen Wildtypen in LB- und dem Minimalmedium M9 (mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl₂) verglichen. Die Aufnahme der Wachstumskurven entspricht der unter 2.6.1 beschriebenen Methodik.

2.3.4 Detektion des Integrationsortes des Transposons

Zur Detektion des Integrationsortes des Transposons ins Genom wird aus den *P. fluorescens* A506- bzw. Bk3-Mutanten mit reduzierter inhibitorischer Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE entweder über eine Phenol-Chloroform-Extraktion oder mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit von Peqlab zunächst die gesamt-DNA isoliert.

Anschließend erfolgt eine Restriktionsenzymspaltung der genomischen DNA von *P. fluorescens* A506 mit *EcoRV*, sowie eine Spaltung der genomischen DNA von *P. fluorescens* Bk3 mit *BglIII*. Die gespaltene DNA von *P. fluorescens* A506-Mutanten wird in den Vektor pBluescript SK von Stratagene ligiert. Die gespaltene DNA von *P. fluorescens* Bk3-Mutanten kann direkt re-ligiert werden, da während der Mutagenese ein R6K DNA Replikationsursprung mit übertragen wird.

Die auf diesem Weg generierten Plasmide werden mittels Elektroporation auf elektrokompente *E. coli* DH5αmer übertragen. Nach Elektroporation erfolgt ein Screenen auf Kanamycin-resistente Zellen, da im Zuge der Mutagenese das Kanamycin-Resistenzgen *nptII* übertragen worden ist.

Aus Kanamycin-resistenten *E. coli* DH5 α mer wird mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas die Plasmid-DNA isoliert und die Plasmide zum Sequenzieren zum SEQLAB Sequence Laboratories in Göttingen geschickt.

Zum Sequenzieren der in pBluescript SK-klonierten DNA von *P. fluorescens* A506 wird der Primer *o-end-up-fwd* 5'ATGCAAGCTTCGGCCGCCTA 3' verwendet, zum Sequenzieren der aus der genomischen DNA von *P. fluorescens* Bk3 generierten Plasmide die Primer *tpnRL17* 5'AACAAGCCAGGGATGTAACG 3' und *tpnRL13* 5'CAGCAACA CCTTCTTCACGA 3'. Alle Primer setzen im „Randbereich“ der Transposons an; die Sequenzierung erfolgt davon ausgehend nach außen, so dass direkte die Transposons flankierende Bereiche der genomischen DNA der *P. fluorescens* A506- bzw. Bk3-Mutanten erfasst werden. Mit ermittelten Sequenzen wird ein Blastn über die Datenbank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) durchgeführt.

2.4 Herstellung von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 und Bk3 sowie *A. pullulans* CF10 und CF40 und Beurteilung ihrer inhibitorischen Wirkung auf *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE*

2.4.1 Herstellung von Wachstumsüberständen für Vorinkubations- und Hemmhofversuche

Die oben aufgeführten Bakterien- und Hefestämmen werden von Agarplatten gepickt und jeweils 50 ml M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl₂ (*P. fluorescens*-Stämme) bzw. 50 ml M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 2% Glukose (*A. pullulans*-Stämme) angeimpft. Die Anzucht erfolgt für drei Tage bei 28°C im Kulturschüttler. Anschließend werden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (20 Minuten, 8000 x g) abzentrifugiert und der Überstand steril filtriert.

Der Überstand wird mit Ankonzentratoren (Vivaspin 20, cut off 5 kDa, von Sartorius) auf ca. 5 ml durch Zentrifugation bei 4°C und 8000 x g eingengt. Der Durchlauf (niedermolekulare Fraktion), der nur noch Moleküle, die kleiner als 5 kDa sind, beinhaltet, wird bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die hochmolekulare Fraktion (mit Molekülen größer als 5 kDa) wird über Nacht gegen zwei Liter 20 mM Hepes (pH 7,0) dialysiert. Der Dialysepuffer wird in dieser Zeit zweimal ausgetauscht.

Anschließend wird die hochmolekulare Fraktion des Wachstumsüberstandes mit den Ankonzentratoren auf ca. 120-150 μ l durch Zentrifugation bei 4°C und 8000 x g eingengt, die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt und sowohl die hoch- als auch nie niedermolekulare Fraktion für Vorinkubations- bzw. Hemmhofversuche (siehe 2.4.2) verwendet.

2.4.2 Beurteilung der inhibitorischen Wirkung der Wachstumsüberstände mittels Vorinkubationsversuchen und Hemmhofversuchen

E. amylovora 222::*TnluxCDABE* wird über Nacht in LB-Medium angezogen. Zur Vorinkubation mit Wachstumsüberständen werden je 1 x 10⁷ Zellen von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* entweder mit 1 μ g Protein/ μ l aus der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände (<5 kDa), oder mit 5 μ l der niedermolekularen Fraktion (< 5 kDa) versetzt. Als Kontrollen dienen Ansätze mit 1 x 10⁷ Zellen von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* ohne Fraktionen der Wachstumsüberstände. Das Endvolumen aller Ansätze beträgt 10 μ l bei einer Endkonzentration von 20 mM Hepes pH 7,0 und 0,5% Glukose. Nach 24-stündiger Vorinkubation im Kulturschüttler bei 28°C werden die Ansätze punktförmig auf LB-Agar aufgetragen.

Die Platten werden bei 28°C inkubiert und die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE über einen Zeitraum von drei Tagen beobachtet.

Bei Durchführung der Hemmhofversuche mit Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 werden - wie zuvor beschrieben - nach Ausplattieren von 9×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mittig der Agarplatte entweder 10 µg Protein der hochmolekularen Fraktion (> 5 kDa) der Wachstumsüberstände in einem Endvolumen von 15 µl oder 15 µl niedermolekulare Fraktion (< 5 kDa) gespottet. Abweichungen hiervon werden im Ergebnisteil aufgeführt. Die Platten werden bei Raumtemperatur inkubiert und die Versuchsansätze auf eine Ausbildung eines Hemmhofes hin beobachtet.

2.5 Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraktion mit 1D und 2D-Gelelektrophorese

2.5.1 Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraktion mit 1D-Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Die Tris-Tricin-Gelelektrophorese wird nach Schägger und von Jagow (1987) durchgeführt. Für die Elektrophorese wurden 9%ige Gele verwendet. Pro Spur wurden 10 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie (nach Meyer und Lamberg, 1965).

2.5.2 Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraktion mit 2D-Elektrophorese

Die 2D Auftrennung der extrazellulären Proteine erfolgt mit isoelektrischer Fokussierung und darauffolgender Tris-Tricin-Gelelektrophorese. Die verwendeten Geräte und IPG-Streifen stammen von der Firma BioRad.

Für die isoelektrische Fokussierung werden bei späterer Silberfärbung 150 µg Gesamtprotein in einem Endvolumen von 20 µl mit 45 µl Lysispuffer (8 M Harnstoff, 65 mM CHAPS und 39 mM Tris freie Base in Wasser, vor Benutzung Zugabe von 100 µl 1 M DTT und 10 µl Biolyte 3-10 zu 1 ml) versetzt. Die Ansätze werden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zu den Ansätzen werden 135 µl Rehydrationslösung (8 M Harnstoff, 33 mM CHAPS und eine Spatelspitze Bromphenolblau in Wasser, vor Benutzung Zugabe von 18 µl 1 M DTT und 5 µl Biolyte 3-10 zu 1 ml Lösung) zugegeben, 200 µl in die Rehydrationskammer pipettiert, ein IPG Streifen mit einem pH-Range von pH 3-10 mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt und mit 1,5 ml Mineralöl überschichtet. Die Streifen werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Streifen entnommen, abgetropft und in die IEF-Kammer eingelegt, so dass die Enden des Streifens jeweils auf angefeuchteten Filterpapierstreifen über den Elektroden liegen. Jeder Streifen wird mit 1 ml Mineralöl überschichtet.

Das Fokussierungsprogramm besteht aus 12 h Rehydratation (ohne Anlegen einer Spannung), 20 Minuten bei 250 V, 2,5 h bei 6000 V und 40.000 Vh bei 6000 V (jeweils 20 µA pro IPG-Streifen).

Nach der Fokussierung werden die IPG-Streifen für 15 Minuten in der Rehydrationskammer in 4 ml Equilibrierungslösung (50 mM Tris-Cl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 345 ml 87 % Glycerol, 70 mM SDS und eine Spatelspitze Bromphenolblau in destilliertem Wasser) mit 40 µg DTT, dann für 15 Minuten in 4 ml Equilibrierungslösung mit 40 µg DTT und 100 µg Jodacetamid inkubiert.

Anschließend werden die IPG-Streifen mit 1 x Gelpuffer gespült und auf ein 9%iges Tris-Tricin-Gel Sammelgel aufgelegt. Nach Gellauf wird eine Silberfärbung nach Nesternko et al. (1994) durchgeführt.

2.6 Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222

Zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den Antagonisten *P. fluorescens* A506 und Bk3 sowie *E. amylovora* 222 werden vergleichende Wachstumskurven in verschiedenen Medien aufgenommen. Zusätzlich erfolgt eine Co-Kultur in Flüssigkultur von Antagonisten und dem biolumineszenten Feuerbranderreger mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung, um abschätzen zu können, ab welchem Zeitpunkt inhibitorische Effekte beobachtet werden können.

Zudem soll eine Co-Kultur von Pathogen und Antagonisten erfolgen und anschließend die Wachstumsüberstände auf die Zusammensetzung ihrer extrazellulären Proteine hin untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen klären, ob die *P. fluorescens*-Stämme auf die Gegenwart von *E. amylovora* 222 möglicherweise mit der Sekretion einer veränderten Proteinzusammensetzung reagieren.

2.6.1 Aufnahme von Wachstumskurven

Vergleichende Wachstumskurven werden jeweils in 50 ml LB-Medium oder dem Minimalmedium M9 mit 10 mM Asparagin, 0,5 mM CaCl₂ und 0,5% Glukose aufgenommen. Die aufgeführten Medien werden mit Übernachtskulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 oder *E. amylovora* 222 angeimpft; die OD₆₀₀ angeimpfter Medien sollte zur Stunde null etwa 0,1-0,2 betragen. Anschließend werden die Ansätze bei 28°C inkubiert und die OD₆₀₀ in regelmäßigen Abständen alle ein bis zwei Stunden bis 10 Stunden nach Animpfen, dann noch nach 24, 32 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse werden mit Excel 2000 dargestellt.

2.6.2 Aufnahme von Wachstumskurven mit gleichzeitiger Biolumineszenzmessung

50 ml LB-Medium werden mit je 2 x 10⁹ Zellen aus Übernachtskulturen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 oder *E. amylovora* 222::TnluxCDABE angeimpft. Jeder Stamm wird einzeln kultiviert, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zusätzlich mit den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 oder Bk3.

Anschließend werden die Ansätze bei 28°C inkubiert und die OD₆₀₀ nach null und zwei Stunden, danach in regelmäßigen Abständen jede Stunde bis zehn Stunden nach Animpfen, sowie zusätzlich nach 24 Stunden gemessen.

Gleichzeitig wird die Biolumineszenz in 50 µl der Proben mit dem Bioluminometer „Junior“ von Berthold Technologies aufgenommen. Die Zeit zur Aufnahme der Biolumineszenz beträgt 30 Sekunden. Die Ergebnisse werden mit Excel 2000 dargestellt.

2.6.3 Untersuchung der extrazellulären Proteine mit 2D-Gelelektrophorese bei Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in An- und Abwesenheit von *E. amylovora* 222

Die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie *E. amylovora* 222 erfolgt wie unter 2.4.1 beschrieben, wobei 50 ml M9-Medium entweder nur mit den aufgeführten Bakterienstämmen einzeln oder in Co-Kultur mit *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222 bzw. mit *P. fluorescens* Bk3 und *E. amylovora* 222 angeimpft wird. Die Anzucht erfolgt optional mit 0,5 mM CaCl₂. Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und entsprechende Färbemethoden sind unter 2.5 beschrieben.

2.7 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände mit Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie

2.7.1 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion mit Gelfiltration

30 ml der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 werden in der Speed Vac auf ca. 1,5 ml eingengt und auf eine 50 cm lange Sephadex G-25-Säule aufgetragen. Als Laufmittel wird destilliertes Wasser verwendet, die Fließgeschwindigkeit beträgt ca. 1,7 ml/min. Die Detektion von der Säule eluierter Substanzen erfolgt mit einem UV-Detektor bei 280 nm. Eluierte Komponenten werden seperiert aufgefangen und für weitere Untersuchungen mit Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie auf 150 µl mit der Speed Vac eingengt. Zur Untersuchung einzelner Fraktionen auf eine inhibitorische Wirkung werden diese unankonzentriert für Hemmhofversuche (siehe 2.4) eingesetzt.

2.7.2 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion mit Dünnschichtchromatographie

Jeweils 7 µl der eingengten Fraktionen aus der Gelfiltration werden auf Polygram[®] SIL G UV₂₅₄ DC-Platten von Macherey Nagel gespottet; zum Vergleich werden 7 µl eines 1%igen Salizylsäurestandards (in Ethanol) aufgespottet. Als Laufmittel dient 70% Ethanol; die Auswertung der Chromatographie erfolgt mit UV-Licht, Ninhydrin-Sprühreagenz zum Nachweis primärer und sekundärer Amine sowie Eisen-Reagenz zum Nachweis von Salizylsäure.

2.7.3 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion mittels Massenspektrometrie

Eingengte Fraktionen aus der Gelfiltration werden 1:1 mit Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 50% Methanol und 1% Essigsäure vorliegt. Die Proben werden auf das Massenspektrometer LCQ (Quadrupol-Ionenfallen Massenspektrometer mit externer Ionenquelle) von Finnigan MAT aufgetragen.

Der Probenauftrag auf die MS beträgt 5 µl/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgt im positiven Modus, d. h. die Proben werden protoniert.

2.8 Überprüfung der biologischen Kontrollkapazität der Wachstumsüberstände sowie von Salizylsäure

2.8.1 Charakterisierung der Kontrollkapazität der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Die Gewinnung der niedermolekularen Fraktion erfolgt wie unter 2.4.1 beschrieben.

Blüten an Zweigen von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (Pathogen-suszeptibel) werden mit der niedermolekularen, unverdünnten Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 besprüht; pro Blüte werden dabei ca. 100 µl der niedermolekularen Fraktion eingesetzt.

Die Infektion erfolgt durch Auftragen von 10 µl Übernachtskultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium, ca. 3×10^7 Zellen) auf den Stempel der Blüten. Kontrollen erfolgen durch ausschließliche Infektion der Blüten ohne weitere Vorbehandlung. Für jeden Versuchsansatz werden zwei Zweige mit drei bis vier Blüten verwendet.

Der Infektionsverlauf wird über einen Verlauf von vier Tagen (Tag 0-3) beobachtet und mit Fotos belegt; zusätzlich wird jeden Tag die Biolumineszenz der Bakterien in den Blüten gemessen. Für die Biolumineszenzmessung (Aufbau der dabei verwendeten CCD-Kamera wurde unter 2.1.1 bereits beschrieben) werden zunächst Lichtbilder der Blüten (Belichtung 1 ms, Gain 3, Binning 4 x 4), anschließend Biolumineszenzbilder (Belichtungszeit 10 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4) aufgenommen.

Die Bilder werden mit IP-Lab 3.06 (Scanalytic) bearbeitet und Falschfarben-Überlagerungsbilder erstellt. Auf eine Quantifizierung der Biolumineszenz wird verzichtet, die Auswertung erfolgt rein qualitativ.

2.8.2 Charakterisierung der Kontrollkapazität der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bzw. von Salizylsäure in „Pear Slice Assays“

Die Gewinnung der Wachstumsüberstände erfolgt wie unter 2.4.1 beschrieben. Neben den Wachstumsüberständen werden zusätzlich Salizylsäurestandards mit Konzentrationen zwischen 0,25 und 1,5% Salizylsäure (in Wasser mit 0,1% Tween20, pH 7) verwendet, optional versetzt mit 0,25 % 1,10-Phenanthrolin.

Die Tests werden mit unreifen Früchten von *Pyrus communis* cv. Conference und Vereinsdechant nach Kearns und Mahanty (1998) durchgeführt, die Früchte hier allerdings oberflächlich mit 70% Ethanol sterilisiert.

Die Birnen werden in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten, in sterile Petrischalen mit in Wasser getränktem Filterpapier überführt und anschließend mit den niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände bzw. den Salizylsäurelösungen besprüht.

Nach kurzer Einwirkzeit werden die Birnenscheiben mit einer *E. amylovora* 222::TnluxCDABE-Suspension besprüht (1×10^8 Zellen/ml, in destilliertem sterilen Wasser).

Die Auswertung erfolgt nach 48-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Generierung autbiolumineszenter *E. amylovora* 222 und Evaluierung der biologischen Wirksamkeit von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf den biolumineszenten Feuerbrandreger in Dual Culture Tests

Durch Übertragung des Plasmids pRL1406 konnten autbiolumineszente *E. amylovora* 222 generiert werden; der Transformant mit stärksten gemessenen Biolumineszenz wurde vereinzelt und als *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bezeichnet (keine Abb. gezeigt).

Bei Co-Kultur gleicher Zellzahlen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf LB-Agar konnte, wie bereits Vorversuche ebenfalls gezeigt haben, nach 24 Stunden durchschnittlich eine etwa 2,5-3-fache Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (bis auf 30-40% der Ausgangsbiolumineszenz nach 0 Stunden) beobachtet werden. Die Kontrolle zeigte hingegen nach 24 Stunden ein 50-fach stärkere Biolumineszenz als die Ansätze mit den Antagonisten. Nach 48 Stunden konnte eine nahezu vollständige Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Antagonisten beobachtet werden (Reduktion auf ca. 1% der gemessenen Biolumineszenz nach 48 Stunden in Bezug auf die Kontrolle, siehe Tabelle 2).

Bei Co-Kultur von je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf gepuffertem PD-Agar (pH 5,6) konnte sowohl bei Dual Culture mit *A.*

pullulans CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 innerhalb von 24 Stunden zunächst eine etwa 2000-fache Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens beobachtet werden. Im Verlauf der weiteren 24 Stunden wurde zwar eine Reduktion der Biolumineszenz beobachtet, die aber immer noch in Bezug auf die gemessenen Biolumineszenz der Kontrolle (*E. amylovora* 222::TnluxCDABE ohne Anwesenheit eines Antagonisten) 40% für die Co-Kultur mit *A. pullulans* CF10 und 14% für die Co-Kultur mit *A. pullulans* CF40 betrug (siehe Tabelle 2).

Bei der gemeinsamen Kultivierung von je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte auf den ungepufferten NBS-Platten sowohl bei Dual Culture mit *A. pullulans* CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 innerhalb von 24 Stunden zunächst eine etwa 180-fache bzw. 80-fache Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens beobachtet werden. Erst in den darauffolgenden 72 Stunden war die Biolumineszenz von *E. amylovora* 222 in Dual Culture mit *A. pullulans* CF40 auf ein nicht mehr detektierbares Level abgesunken, in Dual Culture mit *A. pullulans* CF10 konnte aber nach 96 Stunden immer noch eine Restbiolumineszenz von 2 % (in Bezug auf die Kontrolle) beobachtet werden (siehe Tabelle 2).

Bei einer Wiederholung dieser Dual Culture Tests auf den gepufferten NBSP-Agarplatten (pH 7,0) konnte zwar auch eine Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* beobachtet werden, diese verlief aber im Vergleich zum ungepufferten System deutlich langsamer ab. Auch hier wurde zunächst innerhalb der ersten 24 Stunden eine deutliche (17-30-fache) Zunahme der Biolumineszenz des Pathogens unter Dual Culture Bedingungen beobachtet. Nach 96 Stunden Kultivierung war allerdings immer noch eine Restbiolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE von 19-23% sowohl in Dual Culture mit *A. pullulans* CF10 als auch mit *A. pullulans* CF40 detektierbar (Tabelle 2).

Tab. 2 Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bzw. *A. pullulans* CF10 und CF40. Die gemessene Biolumineszenz (nach 24, 48, 72 und 96 Stunden) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Antagonisten wurde prozentual auf die gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (bei alleinigem Auftrag auf LB-Agar) bezogen.

		Relative Biolumineszenz [%] von <i>E. amylovora</i> 222::TnluxCDABE in Gegenwart von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3 sowie <i>A. pullulans</i> CF10 und CF40					
<i>P. fluorescens</i>		A506	Bk3				
	24 Stunden	2	2				
	48 Stunden	1	1				
<i>A. pullulans</i>		PD-Agar (pH 5,6)		NBS-Agar (pH 5,8)		NBSP-Agar (pH 7,2)	
		CF10	CF40	CF10	CF40	CF10	CF40
	24 Stunden	73	63	10	3	84	64
	48 Stunden	62	19	33	4	27	25
	72 Stunden	40	14	10	0	19	18
	96 Stunden	-	-	2	0	23	19

Insgesamt verlief die Reduktion von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 auf den verwendeten Medien PDA, NBS und NBSP im Vergleich zu den Bakterienstämmen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verzögert. Bei allen Ansätzen mit den Hefen wurde zunächst eine Zunahme der Biolumineszenz innerhalb von 24 Stunden beobachtet, bevor eine Reduktion der Biolumineszenz bedingt durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 gezeigt werden konnte. Lediglich auf einem ungepufferten, bereits leicht saurem Medium (NBS-Agar) konnte eine vollständige Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE innerhalb von 72 Stunden beobachtet werden.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 reduzierten hingegen bereits innerhalb von 24 Stunden deutlich die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE; nach 48 Stunden war die Biolumineszenz bis zu einem nahezu nicht mehr detektierbaren Level abgesunken, während die Kontrolle ohne Antagonist nach wie vor eine starke Biolumineszenz zeigte. Unter *in vitro* Bedingungen sind *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 demnach, was die Geschwindigkeit der Unterdrückung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE angeht, *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 überlegen.

A. pullulans CF10 bzw. CF40 sind in der Lage, Kulturmedien anzusäuern. Wachstumsversuche zeigten, dass bei einer Kultivierung dieser beiden Stämme in NBS-Medium (pH 5,8) der pH innerhalb von drei Tagen auf ca. pH 4 abfällt (nicht gezeigt). Dieser pH bietet keine möglichen Wachstumsbedingungen für *E. amylovora*. Es ist zu vermuten, dass der antagonistische Wirkmechanismus der untersuchten Hefen unter anderem über eine Ansäuerung von Kulturmedien stattfindet, was von Kunz (2005) bereits beschrieben worden ist.

In Hemmhofversuchen, bei denen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf dem gewählten Minimalagar ausplattiert worden ist und ganze Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in die Mitte der Platte gespottet worden waren, war bereits nach 24 Stunden im Bereich um die Kolonie der Antagonisten eine deutliche Abnahme der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu beobachten. Nach 48 Stunden hatte sich dieser Bereich weiter ausgedehnt und wurde zu einer lytischen Zone, wo kein Wachstum des Feuerbrandregers mehr beobachtet werden konnte (Abb. 4). Eine Rückisolierung des Feuerbrandregers aus diesem Bereich durch Überführung von etwas Agar in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin schlug fehl; es ist davon auszugehen, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich der lytischen Zone abgestorben ist.

Wurde *E. amylovora* 222::TnluxCDABE alleine auf Minimalmedium ausplattiert, so wuchs der autobiolumineszente Feuerbrandregger gut flächendeckend an und zeigte nach 24 Stunden eine deutlich messbare Biolumineszenz.

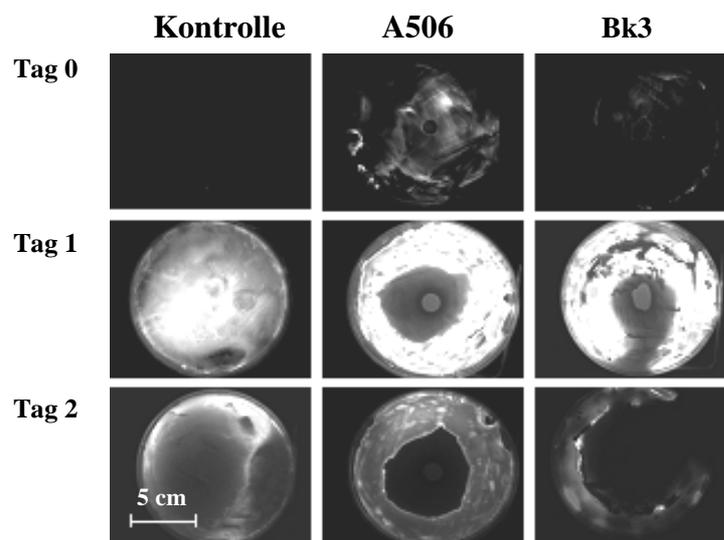


Abb. 4 Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmtest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 oder Bk3 auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen (100 µl, in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur der gewählten Antagonisten (in LB-Medium). Kontrolle: ohne Antagonist. A506: *P. fluorescens* A506, Bk3: *P. fluorescens* Bk3.

Unter Eisenmangelbedingungen produzieren *P. fluorescens*-Stämme Siderophore; hierbei handelt es sich um niedermolekulare Moleküle, die die Funktion haben, Eisen zu binden und so der Zelle bereit zu stellen (Varma und Chincholkar 2007). In Gegenwart von 0,1-0,2 mM FeCl₃ wird die Bildung von Siderophoren unterdrückt (Joyner und Lindow 2000, Rachid und Ahmed 2005).

Eine Involvierung von Siderophoren in die Inhibierung von Pathogenen von Pflanzen ist bereits beschrieben worden, als Beispiel soll hier das System *P. fluorescens* – *E. carotovora* var. *carotovora* (Erreger der Knollen-Nassfäule bei Kartoffeln) genannt werden (Helmy et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob möglicherweise durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 produzierte Siderophore an der Ausbildung der Hemmhöfe beteiligt sind.

Die weiter oben beschriebenen Versuchsansätze wurden dafür unter Supplementierung des Minimalmediums mit 0,2 mM FeCl₃ wiederholt und auf eine Ausbildung eines Hemmhofes um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hin beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ im verwendeten Minimalmedium die Ausbildung der Hemmhöfe deutlich geringer ausfiel als auf Medium, dem nicht FeCl₃ zugesetzt wurde. Ein vollständiges Fehlen der Hemmhöfe lag allerdings nicht vor (Abb. 5). Diese Ergebnisse lassen mutmaßen, dass möglicherweise Siderophore für die Inhibierung des Feuerbrandregers mit verantwortlich sind, aber zusätzlich andere Komponenten eine Rolle spielen müssen.

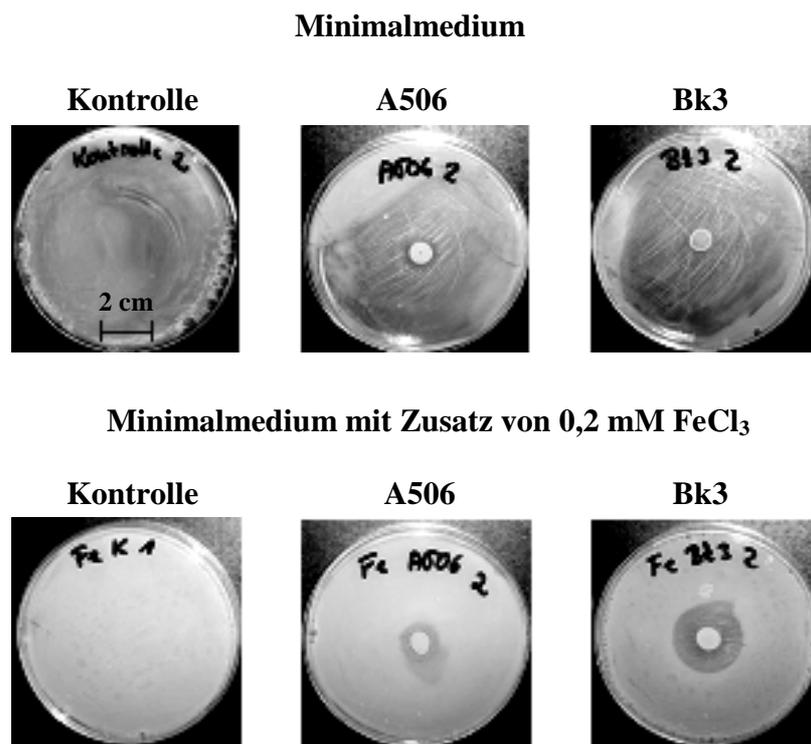


Abb. 5 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium mit und ohne 0,2 mM FeCl₃ nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$, in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils ca. $6,5 \times 10^7$ Zellen einer Übernachtskultur von *P. fluorescens* A506 oder Bk3 (in LB-Medium), jeweils drei Wiederholungen. Kontrolle: ohne Antagonist.

3.1.2 Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und Charakterisierung der Mutanten

Die Mutagenese von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte erfolgreich durchgeführt werden; für *P. fluorescens* A506 wurden insgesamt 4776 Mutanten vereinzelt und gescreent, für *P. fluorescens* Bk3 2086.

Insgesamt konnten über das 3-stufige Screening für *P. fluorescens* A506 sechs Mutanten (#8-42, #19-56, #29-60, #37-54, #39-55, #96-6-175) und für *P. fluorescens* Bk3 5 Mutanten (#1-15, #8-15, #8-28, #13-17, #16-22) ermittelt werden, die auf LB-Medium in gleicher Zellzahl mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (je 1×10^7 Zellen in LB-Medium) nur noch eine eingeschränkte Hemmung gegenüber dem autobiolumineszenten Feuerbranderreger aufwiesen (siehe Abb. 6, Tabelle 3). Durch Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und der Bestimmung der RLUs konnte berechnet werden, inwieweit die Mutanten im Vergleich zum Dual Culture Test von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit den Wildtypen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine verminderte Hemmung aufwiesen.

Für die Mutanten von *P. fluorescens* A506 konnte dabei im Vergleich zum Wildtyp an Tag 1 der Messung eine um 6-72% verminderte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden, an Tag 2 der Messung eine um 10-40% verminderte. Insbesondere Mutante #8-42 stellte sich dabei mit einer nur noch geringen Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf LB-Medium heraus.

Im Vergleich zum Dual Culture Test mit dem Wildtyp von *P. fluorescens* Bk3 zeigten die Mutanten von Bk3 eine um 73-144% verminderte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE an Tag 1 der Messung, sowie um 15-139% schlechtere an Tag 2 (Werte >100% ergaben sich aus einer stärkeren gemessenen Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Mutanten im Vergleich zur Kultur ohne Antagonist, was neben der herabgesetzten Hemmung möglicherweise auf ein stärkeres Verlaufen der auf die Agarplatten aufgespotteten Dual Culture-Ansätze und damit ein flächigeres Anwachsen der Zellen zurückzuführen ist). Die am meisten herabgesetzte Hemmung wurde für Mutante #16-22 gemessen.

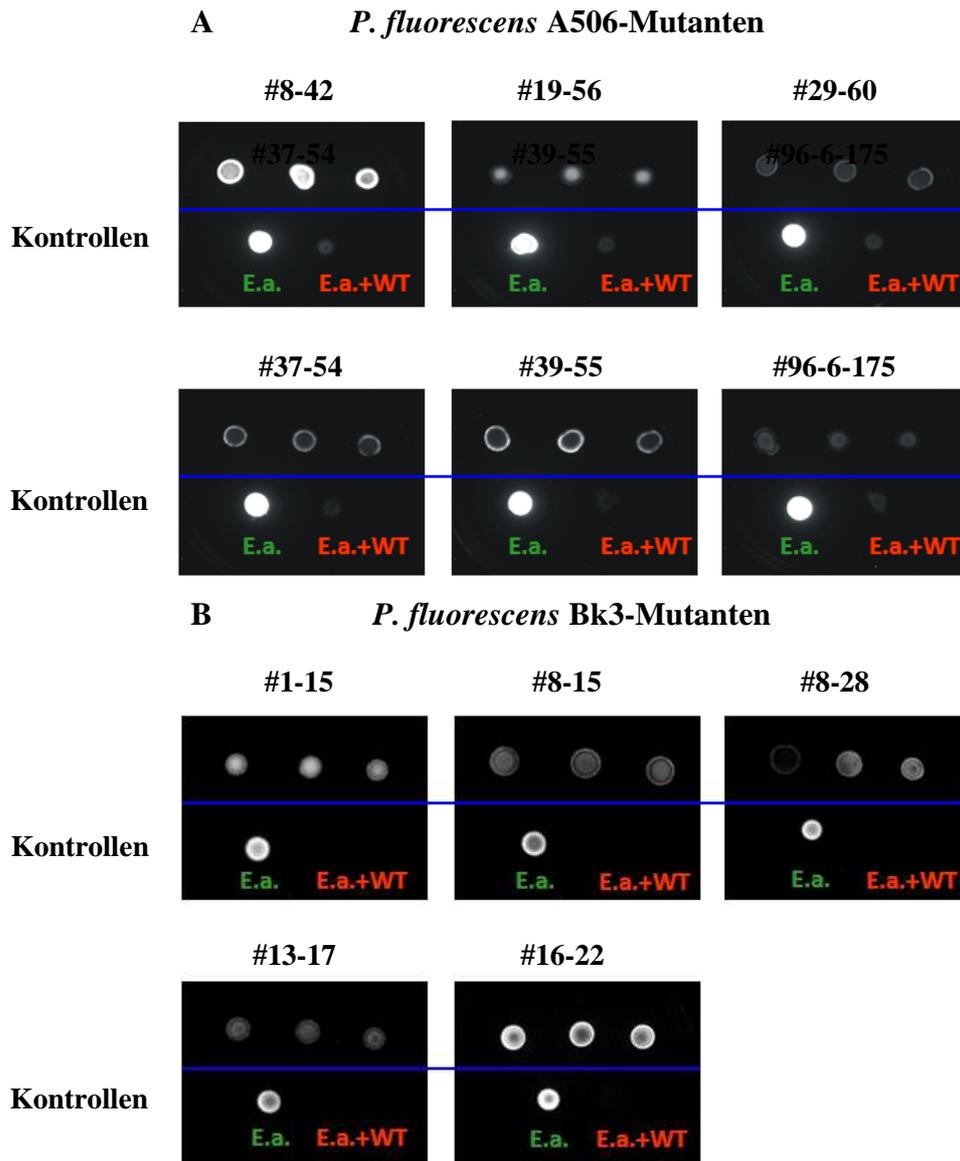


Abb. 6 Screening der Insertionsmutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 im Dual Culture Test mit gleicher Zellzahl. **A** *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Mutanten von *P. fluorescens* A506. **B** *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in Gegenwart der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3. Je Ansatz wurden jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE und den Mutanten vermischt (in einem Endvolumen von 10 μ l LB-Medium) und auf LB-Agarplatten gespottet. **Kontrollen** E.a.: 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, E.a. + WT: 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit 1×10^7 Zellen des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Messung der Biolumineszenz nach 48 Stunden (Belichtungszeit 5 sec, Gain 3, Binning 4 x 4).

Tab. 3 Dual Culture Tests mit je 1×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* und den *P. fluorescens* A506- und Bk3-Mutanten (Mutante #x) sowie dem Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Die gemessene Biolumineszenz (nach 24 und 48 Stunden) von *E. amylovora*::*TnluxCDABE* in Gegenwart des Wildtyps und der Mutanten wurde prozentual auf die gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora*::*TnluxCDABE* (bei alleinigem Auftrag auf LB-Agar, dieser Wert wurde auf 100% gesetzt) bezogen.

relative Biolumineszenz von <i>E. amylovora</i> 222::<i>TnluxCDABE</i> in Gegenwart von <i>P. fluorescens</i> A506 bzw. Bk3		
Stamm	nach 24 Stunden [%]	nach 48 Stunden [%]
<i>P. fluorescens</i> A506		
Wildtyp	3	4
Mutante #8-42	75	49
Mutante #19-56	19	36
Mutante #29-60	13	21
Mutante #37-54	16	6
Mutante #39-55	17	20
Mutante #96-6-175	8	10
<i>P. fluorescens</i> Bk3		
Wildtyp	1	1
Mutante #1-15	84	56
Mutante #8-15	74	22
Mutante #8-28	91	50
Mutante #13-17	88	16
Mutante #16-22	145	140

2D-Gele der Wachstumsüberstände der *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten zeigten auf, dass im Vergleich zum Wildtyp verschiedene extrazelluläre Proteinspots fehlten bzw. in einer geringeren Konzentration vorlagen. Bei *P. fluorescens* Bk3-Mutanten schienen hingegen einige Proteine auch stärker im Vergleich zum Wildtyp exprimiert worden zu sein.

Der Wachstumsüberstand der Mutante *P. fluorescens* A506 #8-42 wurde durch Anzucht der Bakterien in LB-Medium gewonnen, da diese Mutante kein Wachstum in M9-Medium zeigte (siehe unten). Der Wachstumsüberstand beinhaltete nach der Bradford-Proteinbestimmung nur ein Drittel der Proteinmenge, die für den Wachstumsüberstand des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 festgestellt werden konnte. Dies zeigte sich auch in den 2D-Gelen. Einzelne Proteinspots auf den 2D-Gelen waren zwar nicht sauber voneinander getrennt, was durch die Vorbehandlung der Proben (Ankonzentration mit PEG 4000) bedingt gewesen sein könnte. Es war aber deutlich zu erkennen, dass der Wachstumsüberstand des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 ein Muster von Proteinen aufweist, das bei der Mutante #8-42 nahezu vollständig fehlt. Mutante A506 #8-42 ist demnach im Vergleich zum Wildtyp nicht nur unfähig, in einem Minimalmedium anzuwachsen (siehe weiter unten), sondern sekretiert auch eine deutlich veränderte Proteinzusammensetzung.

Die Mutanten #8-15 und #16-22 von *P. fluorescens* Bk3 nahmen ebenso eine Sonderstellung ein; auch sie zeigten eine starke Einschränkung in der Zusammensetzung ihrer extrazellulären Proteine; die Gele wiesen nur wenige deutliche Spots auf (keine Abbildungen der Gele gezeigt, Zusammenfassung verändert sekretierter Proteine in Tab. 4).

Ob die fehlenden oder schwächer bzw. anders sekretierten Proteine der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 letztlich mit der herabgesetzten inhibitorischen Wirksamkeit der Mutanten gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zusammenhängen, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden; die Sequenzierung der Mutanten ergab Integrationsorte der Mutationen, bei denen keine Gene speziell für extrazelluläre Proteine oder andere extrazelluläre Moleküle betroffen waren. Hierfür bedürfte es einer Sequenzierung und Identifizierung der Proteinspots. Zudem ist durch die verwendete Silberfärbung nicht sicher gestellt, dass es sich bei den Spots auch tatsächlich um Proteine handelt, da mit dieser Färbemethode auch Nukleinsäuren, Lipide, Lipopolysaccharide und Glykolipide angefärbt werden.

Tab. 4 Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 im Verhältnis zum jeweiligen Wildtyp. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 0,5 mM CaCl₂ (*P. fluorescens* A506 #8-42) bzw. M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 2% Glukose und 0,5 mM CaCl₂ (alle übrigen Mutanten) Proteine wurden mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. (Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. 1. Dimension: IPG-Streifen mit pH-Range von pH 3-10, 2. Dimension: 9 %iges Tris-Tricin-Gel). Die Tabelle führt die apparenten Proteinmassen sowie den geschätzten pH-Bereich, in dem die Proteine liegen, auf.

<i>P. fluorescens</i> A506			<i>P. fluorescens</i> Bk3					
Mutante	schwächer exprimiert/fehlend		schwächer exprimiert/fehlend		stärker exprimiert			
	Proteinbereich [kDa]	pI	Proteinbereich [kDa]	pI	Proteinbereich [kDa]	pI		
#8-42	Zahlreiche Proteine fehlend		Proteine nicht klar dargestellt, zahlreiche fehlend					
#19-56	40	6-7	#8-15	17-34	6-7	#8-28	50	9
	50	9		17	6-7		17	4
	55-80	6-7		#13-17	17-34		6-7	65
#29-60	40	4	Proteine nicht klar dargestellt, zahlreiche fehlend					
#37-54	55-80	6-7	#16-22					
	#39-55	40		4				
#96-6-175	40	4						
	50	50						

Wildtyp und Mutanten von *P. fluorescens* A506 unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten in LB-Medium kaum. Lediglich Mutante #8-42 zeigte ein leicht verzögertes Wachstumsverhalten. Alle Stämme befanden sich nach 48 Stunden in der stationären Phase bei einer OD₆₀₀ von 2,6-2,8. In M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin hingegen wuchs der Wildtyp am besten an, Mutante #19-56 zeigte ein deutlich verlangsamtes Wachstum und Mutante #8-42 war nicht in der Lage, in diesem Medium anzuwachsen. Um auszuschließen, dass Mutante #8-42 lediglich Asparagin nicht mehr als organische Stickstoffquelle nutzen kann, wurde dieser Stamm auch in M9-Medium mit jeweils 10 mM der Aminosäuren Asparaginsäure, Arginin, Prolin, Methionin oder Glycin bzw. mit 5 mM Nitrat kultiviert. Auch in diesen Medien wuchs Mutante #8-42 nicht an, während der Wildtyp von *P. fluorescens* A506 alle untersuchten Aminosäuren und Nitrat mehr oder weniger effektiv als Stickstoffquelle nutzen konnte.

Die Mehrzahl der Mutanten von *P. fluorescens* Bk3 hatten in LB und M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp gezeigt. Zwar waren einige der Mutanten (#8-15, #8-28, #13-17 in LB, #13-17 in M9-Medium) etwas verlangsamt angewachsen, trotzdem erreichten sowohl Wildtyp als auch Mutanten nach 48 Stunden eine OD₆₀₀ von etwa 2,4 in LB-Medium und 1,9 in M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin. Mutante #16-22 war in beiden Medien deutlich langsamer angewachsen und erreichte in LB-Medium nach 48 Stunden nur eine OD₆₀₀ von 1,9. In LB-Medium haben sich sowohl Wildtyp als auch Mutanten nach 48 Stunden in der stationären Phase befunden. Gleiches konnte für M9-Medium gezeigt werden, wobei sich Mutante #16-22 nach 48 Stunden noch in der exponentiellen Wachstumsphase befunden hat. Die Auswertung des Wachstumsverhaltens der generierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu Stunde 10 nach Inokulation ist ausführlich in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5 Wachstumsverhalten der Mutanten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in LB-Medium und M9-Medium im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Die gemessene OD₆₀₀ nach 10 Stunden in den jeweiligen Kulturen der Mutanten wurde auf die OD₆₀₀ der Wildtypen bezogen und die Werte prozentual dargestellt.

<i>P. fluorescens</i> A506	Wachstumsverhalten [%]		<i>P. fluorescens</i> Bk3	Wachstumsverhalten [%]	
	LB-Medium	M9-Medium		LB-Medium	M9-Medium
Wildtyp	100	100	Wildtyp	100	100
Mutante #8-42	93	1	Mutante #1-15	99	101
Mutante #19-56	102	72	Mutante #8-15	99	97
Mutante #29-60	100	87	Mutante #8-28	100	100
Mutante #37-54	101	85	Mutante #13-17	98	66
Mutante #39-55	99	83	Mutante #16-22	73	24
Mutante #96-6-175	105	88			

Die Ausbildung von Hemmhöfen auf Minimalmedium konnte nicht nur durch den Wildtyp von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beobachtet werden, sondern auch durch die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Mutanten. Für alle Mutanten konnte nach 48 Stunden Inkubation eine deutliche Reduktion der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich um die Kolonie der Mutanten sowie die Ausbildung einer lytischen Zone beobachtet werden (keine Abb. gezeigt), auch wenn die Reduktion der Biolumineszenz nach 24 Stunden bei einigen Mutanten (*P. fluorescens* A506 #8-42 und #29-60, *P. fluorescens* Bk3 #8-28 und #16-22) geringer ausfiel als bei den Wildtypen.

Die Ergebnisse zeigen, dass – unabhängig von der Mutagenese – sowohl Wildtyp als auch Mutanten von intakten Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 extrazelluläre Komponenten in das hier gewählte Kulturmedium absondern, die sich inhibitorisch auf die Stoffwechselaktivität von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auswirken.

Die Mutanten haben also auf LB-Medium eine reduzierte inhibitorische Wirkung auf den Feuerbranderreger und ein teilweise verzögertes Wachstumsverhalten in LB- und M9-Medium. Ihre extrazelluläre Proteinzusammensetzung unterscheidet sich deutlich von der des jeweiligen Wildtyps. Dennoch produzieren sie immer noch Hemmhäfe auf einem Minimalagar. Die Ergebnisse zeigen, dass demnach nicht nur Wachstumskonkurrenzen als Ursache für den Antagonismus von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE eine Rolle spielen, sondern zusätzlich extrazelluläre Komponenten mit inhibitorischer Wirkung vorliegen müssen.

Die Detektion des Integrationsortes des Transposons konnte für alle Mutanten, ausgenommen A506 #39-55, erfolgreich durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Mutagenese keine Genprodukte betroffen waren, die direkt oder indirekt mit der Sekretion möglicher inhibitorisch wirksamer Komponenten zusammenhängen, sondern vielmehr allgemeine Stoffwechselprozesse (Tabelle 6).

Tab. 6 Ergebnisse der Detektion des Integrationsortes des Transposons bei den *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3-Mutanten. Zur Detektion des Integrationsortes wurde jeweils ein Blastn-Datenbankabgleich auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> mit den von SeqLab ermittelten Sequenzen durchgeführt.

Mutante	homolog zu	Ursprung	Gene ID*
<i>P. fluorescens</i> A506 #8-42	Phosphoglukosamin-Mutase	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3715232
<i>P. fluorescens</i> A506 #19-56	Kalium-Uptake-Protein	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	3476496
<i>P. fluorescens</i> A506 #29-60	Citrat-Synthase	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3716821
<i>P. fluorescens</i> A506 #37-54	Kationen ABC-Transporter	<i>P. fluorescens</i> SBW25	7818324
<i>P. fluorescens</i> A506 #96-6-175	Schwermetall Sensor-Histidin-Kinase	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	3475981
<i>P. fluorescens</i> Bk3 #1-15	Oligopeptidase A	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3717789
<i>P. fluorescens</i> Bk3 #8-15	DEAD/DEAH-Box Helikase-ähnlich	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3714013
<i>P. fluorescens</i> Bk3 #8-28	GTP-bindendes Protein Typ A	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	3480979
<i>P. fluorescens</i> Bk3 #13-17	RNase T	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3717889
<i>P. fluorescens</i> Bk3 #16-22	Thiamin Biosynthese Protein	<i>P. fluorescens</i> Pf0-1	3713374

*Datenbank von www.ncbi.nlm.nih.gov/

Insofern ist die hier durchgeführte Mutagenese zwar sehr aufwendig gewesen, brachte aber nicht die erhofften Ergebnisse in der Identifizierung von Genen, deren Produkte für eine Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die extrazellulären hoch- und niedermolekularen Komponenten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gelegt.

3.1.3 Charakterisierung der extrazellulären hoch- und niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 durch Vorinkubationsversuche und Hemmhofversuche

Nach einer Vorinkubation von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mit den ankonzentrierten Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte direkt nach Auftrag auf LB-Agar eine vollständige Reduktion der Biolumineszenz gezeigt werden. Nach 24 Stunden konnte zwar gezeigt werden, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf der Agarplatte anwuchs, die gemessene Biolumineszenz war aber dennoch um durchschnittlich 74-80% im Vergleich zur Kontrolle reduziert und nach 48 Stunden immer noch um 35-44% (Abb. 7). Die Vorinkubation mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 führte zu keiner Reduktion der Stoffwechselaktivität des Pathogens bei Auftrag auf LB-Agar.

Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beinhalteten demnach hochmolekulare Komponenten, die auf LB-Medium in der Lage sind, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zu hemmen.

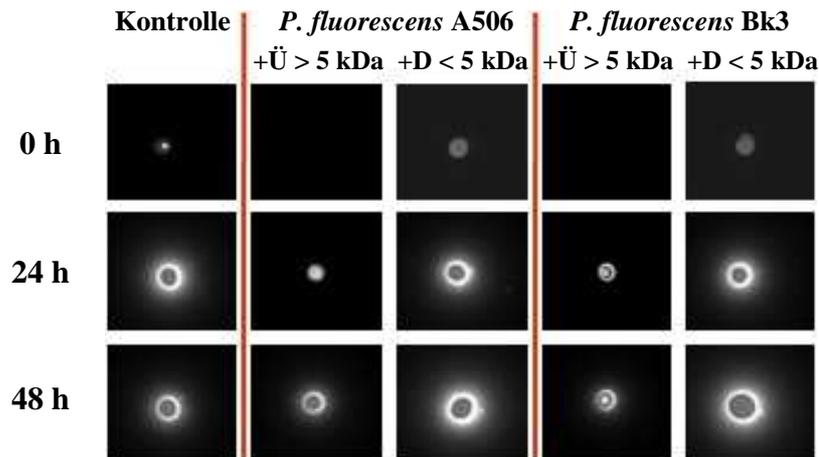


Abb. 7 Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nach Vorinkubation mit der hoch- und niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. Jeweils 1×10^7 Zellen von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE wurden mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protein aus der hochmolekularen Fraktion ($\ddot{U} > 5 \text{ kDa}$) sowie $5 \mu\text{l}$ der niedermolekularen Fraktion ($D < 5 \text{ kDa}$) versetzt, 24 Stunden vorinkubiert und in $10 \mu\text{l}$ Endvolumen (mit 20 mM Hepes pH 7,0 und $0,5\%$ Glukose) auf LB-Agar gespottet. Messung der Biolumineszenz nach 0, 24 und 48 Stunden (Belichtungszeit 2 Minuten, Gain 3, Binning 4×4).

Die beste Wirksamkeit der hochmolekularen Fraktion konnte bei pH 7,0 beobachtet werden. Eine Erhitzung der hochmolekularen Fraktion auf 80°C für 10 Minuten führte zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit.

Eine 24-stündige Vorinkubation von auto biolumineszenten *E. amylovora* 222 mit der hoch- bzw. niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 bewirkte keine messbare Reduktion der Biolumineszenz des Pathogens (keine Abbildung gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass die Hefestämme keine *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hemmenden Wirkkomponenten sezernieren.

Bei Auftrag der zellfreien, hoch- oder niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalagar, auf den zuvor *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert worden ist, konnte bereits nach 24 Stunden eine deutliche Reduzierung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden. Nach 48 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur hatte sich diese Reduktion deutlich intensiviert und ausgehend vom Auftragsort der Wachstumsüberstände konnte die Ausbildung einer lytischen Zone gezeigt werden, wo kein Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mehr zu beobachten war (Abb. 8). Eine Reisolierung des Feuerbranderreger aus diesem Bereich durch Überführung von etwas Agar in LB-Medium mit $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin schlug fehl; es ist davon auszugehen dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Bereich der lytischen Zonen abgestorben ist.

Diese Versuche zeigen, dass sowohl in der hochmolekularen Fraktion als auch in der niedermolekularen Fraktion Moleküle vorhanden sein müssen, die sich auf Minimalmedium inhibitorisch auf das Wachstum des Feuerbranderreger auswirken und möglicherweise zu einer Lyse von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE führen.

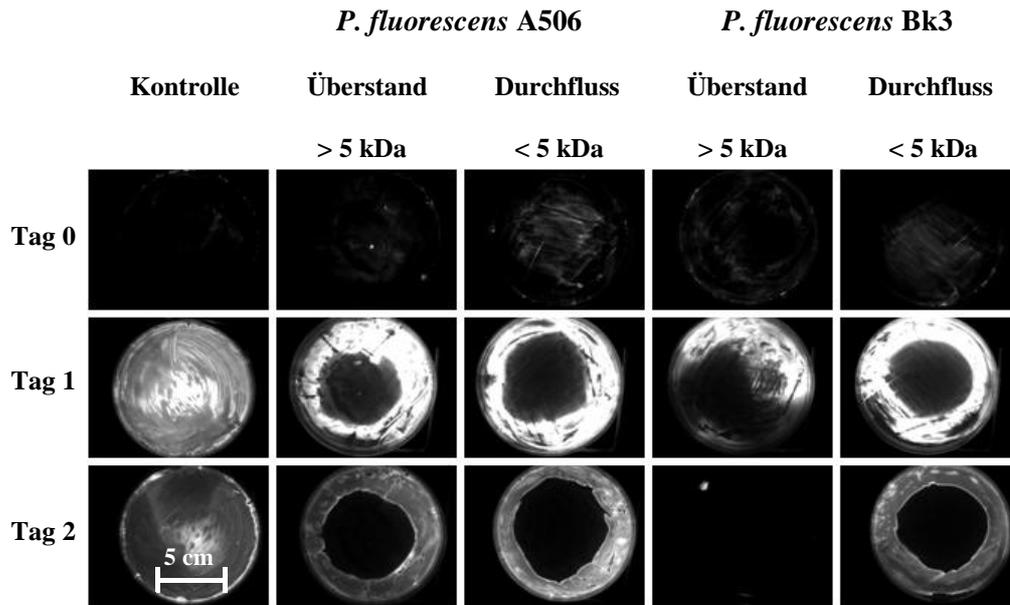


Abb. 8 Messung der Biolumineszenz bei einem Hemmtest von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Minimalmedium. Belichtungszeit 5 Sekunden, Gain 3, Binning 4 x 4. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein/ $15 \mu\text{l}$ aus der hochmolekularen Fraktion (Überstand) bzw. $15 \mu\text{l}$ aus der niedermolekularen Fraktion (Durchfluss) der Wachstumsüberstände. Kontrolle ohne Wachstumsüberstände.

Erfolgte allerdings die Anzucht von *P. fluorescens* A506 und Bk3 in Gegenwart von $0,2 \text{ mM}$ FeCl_3 , so konnte gezeigt werden, dass die hochmolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände noch immer eine inhibitorische Wirkung auf den *E. amylovora* 222::TnluxCDABE aufwies, aber keine hemmende Wirkung mehr durch die niedermolekulare Fraktion festgestellt werden konnte (keine Abb. gezeigt).

Die Ergebnisse bestätigen die zuvor durchgeführten Untersuchungen, bei der durch intakte Zellen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 deutlich kleinere Hemmhöfe auf einem mit $0,2 \text{ mM}$ FeCl_3 supplementierten Minimalmedium als auf einem Medium ohne $0,2 \text{ mM}$ FeCl_3 ausgebildet worden sind, aber dennoch die inhibitorische Wirkung nicht vollständig aufgehoben wurde. Die Supplementierung des Kulturmediums mit FeCl_3 könnte also möglicherweise Einfluss auf die Produktion oder Sekretion extrazellulärer Komponenten wie beispielsweise Siderophoren nehmen.

3.1.4 Charakterisierung der extrazellulären Proteinfraction der gewählten Antagonisten mittels Tris-Tricin-Gelelektrophorese

In den Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sind zahlreiche Proteine enthalten. Die Proteinzusammensetzung scheint dabei zwischen den beiden gewählten bakteriellen Antagonisten sowohl in Zusammensetzung als auch in der Konzentration unterschiedlich zu sein. Der Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 beinhaltet Proteine mit apparenten molaren Massen zwischen ca. 85 und 7 kDa . In Gegenwart von $0,5 \text{ mM}$ CaCl_2 wurde nachweislich mit Bradford-Proteinbestimmung deutlich mehr Protein in den Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 abgegeben als ohne Zugabe von $0,5 \text{ mM}$ CaCl_2 (ca. $4\text{-}5 \times$ mehr); zudem wurde insbesondere eine prominente Proteinbande von ca. 45 kDa besonders stark sekretiert. Auf dem Gel ist diese Bande klar hervorgehoben, während andere Proteine scheinbar schwächer exprimiert worden sind (Abb. 9 A). Allerdings wurden jeweils $10 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aus den Wachstumsüberständen auf die

Proteingele aufgetragen, so dass andere Proteine der Wachstumsüberstände auf Grund des hohen Verhältnisses des 45 kDa Proteins in den Hintergrund traten.

Im Wachstumsüberstand von *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnten Proteinbanden mit apparenten molaren Massen zwischen ca. 95 und 16 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 9 B). *A. pullulans* CF10 scheint dabei ein vielfältigeres Spektrum als *A. pullulans* CF40 zu sekretieren, hier lagen zusätzlich Proteinbanden mit apparenten molaren Massen von ca. 80, 55, 50, 40, 37, 27 und 25 kDa vor, die bei *A. pullulans* CF40 nicht detektiert wurden.

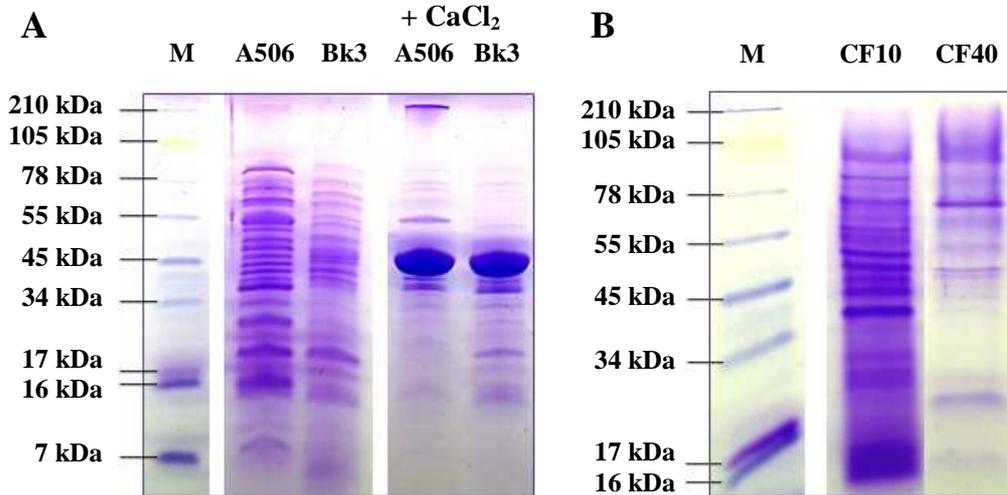


Abb. 9 (A) Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3) sowie **(B)** *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 (CF10 bzw. CF40). Die Wachstumsüberstände wurden in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose (bzw. 2% Glukose bei *A. pullulans*-Stämmen) und optional mit 0,5 mM CaCl₂ angezogen. Auftrag: je 10 µg Gesamtprotein. 9%iges Tris-Tricin-Gel, Coomassie-Färbung M: Marker See Blue Plus2, Invitrogen.

Mittels der 2D-Gele der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 ist es möglich gewesen, die einzelnen Proteine verbessert voneinander abzutrennen, als es mit einem eindimensionalen Gel möglich gewesen ist. Wie auch schon aus den eindimensionalen Gelen ersichtlich wurde, waren auch hier Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration der Proteine bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zu erkennen (Abb. 10). Ebenfalls konnten Proteine mit apparenten molaren Massen zwischen 85 und 7 kDa gezeigt werden; die meisten Proteine lagen im pH-Bereich zwischen pH 4 und pH 8.

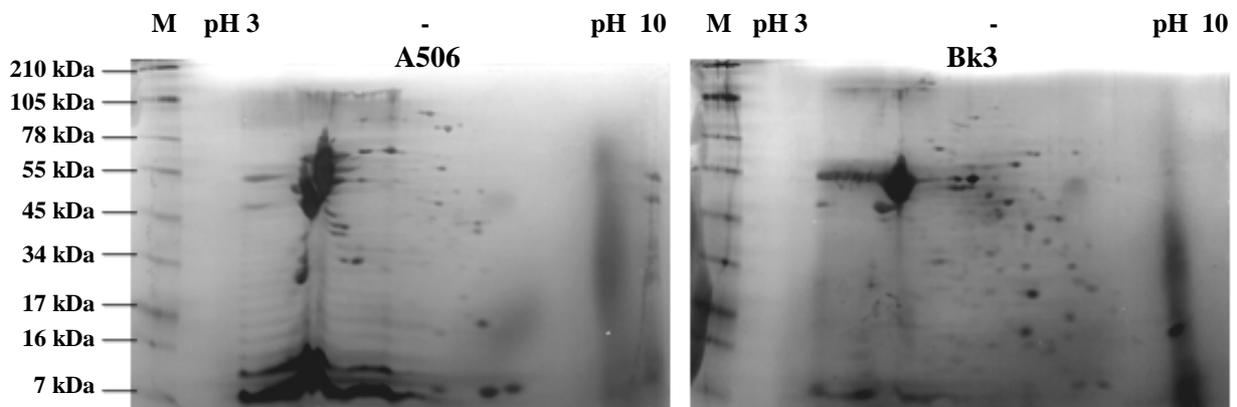


Abb. 10 2D-Gele der Wachstumsüberstände des Wildtyps von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM CaCl₂. Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. Der verwendete IEF-Streifen hatte einen pH-Range von pH 3-10, für die 2. Dimension wurde ein 9%iges Tris-Tricin-Gel verwendet. Die Gele wurden Silber-gefärbt. M: Marker See Blue.

3.1.5 Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *E. amylovora* 222

Aus den Wachstumskurven wurde ersichtlich, dass *E. amylovora* 222::TnluxCDABE sowohl in LB- als auch M9-Medium langsamer wächst als die beiden *P. fluorescens*-Stämme. *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erreichte nach etwa 24 Stunden in LB-Medium und einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 die stationäre Phase und ging nach 32 Stunden, erkennbar an der Abnahme der optischen Dichte, in die Absterbephase über. Beide *P. fluorescens*-Stämme hatten hingegen nach 24 Stunden eine deutlich höhere OD₆₀₀ von 2,5 (A506) und 2,9 (Bk3). *P. fluorescens* Bk3 ging ebenfalls nach 32 Stunden in die Absterbephase über, hatte nach 48 Stunden aber immer noch eine OD₆₀₀ von 2,5. In Kulturen von *P. fluorescens* A506 konnte nach 48 Stunden immer noch ein leichtes Wachstum beobachtet werden; die Kulturen erreichten eine OD₆₀₀ von 2,8. In M9-Medium erreichte keiner der Stämme die Absterbephase innerhalb von 48 Stunden. Bei *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte nach 48 Stunden noch immer eine Zunahme der OD₆₀₀ beobachtet werden, *E. amylovora* 222::TnluxCDABE erreichte nach 24 Stunden eine OD₆₀₀ von 0,64, danach war keine maßgebliche Veränderung der optischen Dichte mehr zu beobachten. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 erreichten hingegen nach 48 Stunden eine OD₆₀₀ von 1,7 bzw. 2,0 (siehe Abb. 11).

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 unterscheiden sich insofern von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in ihrem Wachstumsverhalten, als dass sie sowohl in einem Voll- als auch einem Minimalmedium schneller anwachsen und eine deutlich höhere OD₆₀₀ erreichten. Auch der Übergang von der stationären in die Absterbephase verlief im Vergleich zu *E. amylovora* 222::TnluxCDABE verzögert.

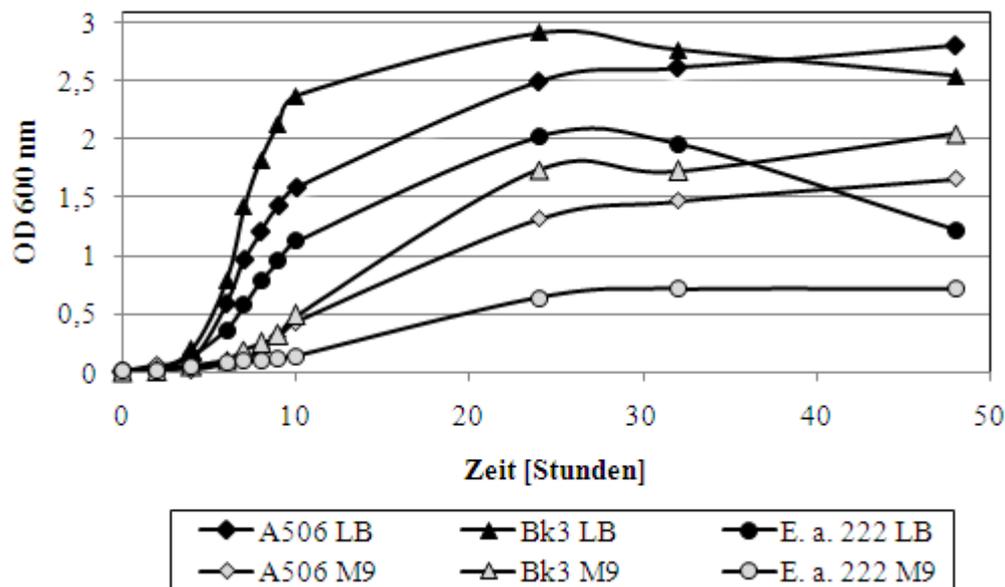


Abb. 11 Wachstumskurven von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (E. a. 222) und *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 (A506 bzw. Bk3) in LB-Medium (LB) und M9-Medium mit 0,5% Glukose und 10 mM Asparagin (M9)

Wurde neben der optischen Dichte zusätzlich die Biolumineszenz gemessen, so konnte gezeigt werden, dass bei alleiniger Kultur von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE trotz des leichten Anstiegs der optischen Dichte innerhalb der ersten fünf Stunden zunächst die Biolumineszenz von ca. 2×10^4 auf 1×10^4 RLUs leicht abnahm, anschließend aber auf 1×10^5 RLUs bis Stunde zehn anstieg. Nach 24 Stunden lag die Biolumineszenz knapp unterhalb des Ausgangswertes, was möglicherweise auf eine Reduktion der Nährstoffe im Kulturmedium zurückzuführen sein könnte.

In Gegenwart von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnte bis Stunde fünf (A506) bzw. Stunde drei (Bk3) eine zur Einzelkultur vergleichbare Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* gemessen werden, danach fiel diese aber auf einen Wert von 1×10^3 RLU (A506) bzw. 1×10^2 RLU (Bk3) ab (Abb. 12). Zu dieser Zeit verlief die Zunahme der optischen Dichte bei Einzelkulturen von *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* noch parallel, bei *P. fluorescens* Bk3 war nach fünf Stunden hingegen die OD_{600} um ca. 0,3 höher als bei *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE*. Nach 24 Stunden konnte keine Biolumineszenz mehr detektiert werden.

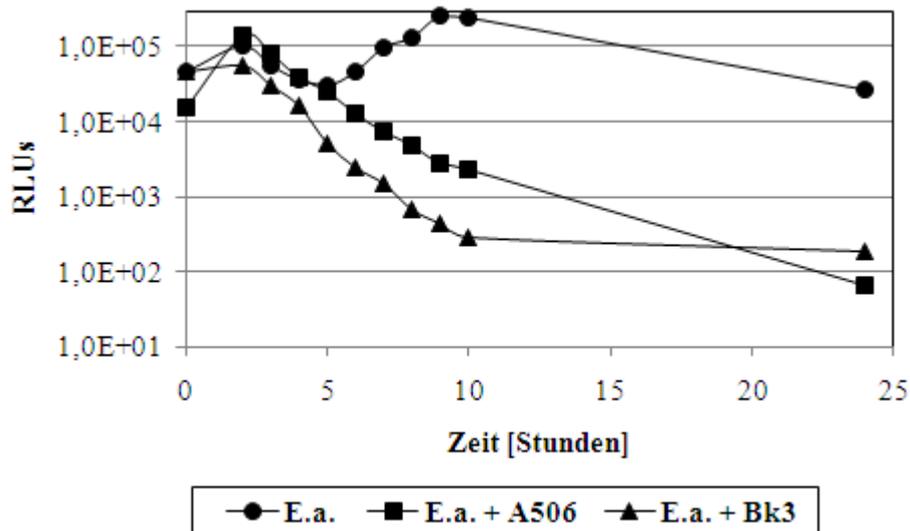


Abb. 12 Im zeitlichen Verlauf gemessene Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* (E. a.); Stamm alleine oder in Co-Kultur mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 kultiviert. Die Biolumineszenz wurde in 50 μ l Zellsuspension mit dem Bioluminometer gemessen, die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden.

Neben der Co-Kultivierung von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* mit *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in LB-Medium und der Messung der Biolumineszenz im zeitlichen Verlauf wurde zusätzlich die extrazelluläre Proteinzusammensetzung beider Antagonistenstämme mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht, wenn sie in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,5 mM $CaCl_2$ in Gegenwart des Feuerbranderregers für drei Tage angezogen worden sind.

Wenn *P. fluorescens* A506 in Gegenwart von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* angezogen wurde, konnte im Wachstumsüberstand eine stärkere Sekretion von Proteinen im Bereich von 78, 45, 34 und 16 kDa, sowie eine schwächere von zwei Proteinen in einem Bereich von ca. 7 kDa beobachtet werden. Wachstumsüberstände bei Co-Kultur von *P. fluorescens* Bk3 und *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* zeigten eine stärkere Sekretion von Proteinen im Bereich von etwa 25 und 15 kDa, sowie schwächere Sekretion von Proteinen in einem Bereich von ca. 65 und 45 kDa (keine Abb. gezeigt).

Stärker oder schwächer exprimierte Spots stimmten nicht mit Spots von einem Gel überein, auf das der alleinige Wachstumsüberstand von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* aufgetragen worden ist, während hingegen verändert sekretierte Proteine häufig auch bei alleiniger Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vorlagen. Dennoch kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die verändert sekretierten Proteine tatsächlich ausschließlich von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 stammen, oder ob es sich um Proteine von *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* handelt.

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Versuchsansätzen wurden noch einmal Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in An- und Abwesenheit von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5 % Glukose, aber ohne CaCl₂ angezogen worden sind, gewonnen. Die gewählten Pseudomonaden produzierten in Gegenwart von CaCl₂ eine deutlich höhere Konzentration extrazellulärer Proteine, so dass dadurch möglicherweise durch den Feuerbranderreger auftretende Effekte auf *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 überdeckt worden waren.

Deutlich erkennbar ist hier eine Heraufregulation von Proteinen im Bereich zwischen 40 und 78 kDa bei Co-Kultur von *P. fluorescens* A506 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, sowie eine Heraufregulation von Proteinen mit apparenten molaren Massen von ca. 45, 20, 17 und 16 kDa bei Co-Kultur von *P. fluorescens* Bk3 und *E. amylovora* 222::TnluxCDABE.

Auf 2D-Gelen der Wachstumsüberstände von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, angezogen in M9-Medium ohne CaCl₂, konnten keine Proteinspots nach Silberfärbung detektiert werden. Auch wenn ebenso an dieser Stelle nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die verändert sekretierten Proteine tatsächlich ausschließlich von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 stammen, so deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Antagonistenstämme auf die Gegenwart des Feuerbranderregers mit einer veränderten Proteinsekretion reagieren.

Alle in Gegenwart des Feuerbranderregers verändert sekretierten Proteine sind zusammengefasst in Tabelle 7 aufgeführt.

Im Vergleich der Anzuchtsmedien (M9-Medium mit und ohne 0,5 mM CaCl₂) sind von der veränderten Sekretion von Proteinen bei Co-Kultur von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE in einem Medium mit CaCl₂ andere Proteine betroffen als in einem Medium ohne CaCl₂.

Eine Maskierung der tatsächlich durch den Feuerbranderreger beeinflussten Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 durch eine CaCl₂-Supplementierung der Kulturmedien ist also möglich. Inwieweit die herauf- oder herunterregulierten Proteine allerdings in einem direkten Zusammenhang mit dem Antagonismus gegenüber dem Feuerbranderregers stehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Zwar wurden Versuche unternommen, die Proteine mittels MALDI-TOF zu sequenzieren, allerdings konnten keine signifikanten Ergebnisse damit erzielt und somit auch keine genaueren Aussagen getroffen werden.

Tab. 7 Überblick über stärker bzw. schwächer exprimierte Proteine von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und optional mit 0,5 mM CaCl₂. Proteine wurden mit 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. (Auftrag: je 150 µg Gesamtprotein. 1. Dimension: IPG-Streifen mit einem pH-Range von pH 3-10, 2. Dimension: 9 %iges Tris-Tricin-Gel). Die Tabelle führt die apparenten molaren Proteinmassen sowie den geschätzten pH-Bereich, in dem die Proteine liegen, auf.

<i>P. fluorescens</i> A506 + <i>E. amylovora</i> 222			<i>P. fluorescens</i> Bk3 + <i>E. amylovora</i> 222		
M9-Medium	Proteinbereich [kDa]	pI	M9-Medium	Proteinbereich [kDa]	pI
+ 0,5 mM CaCl ₂	stärker exprimiert		+ 0,5 mM CaCl ₂	stärker exprimiert	
	16	6		15	8
	34	7		16	6
	45	7		schwächer exprimiert	
	78	7-8		45	7
schwächer exprimiert		65	6		
- 0,5 mM CaCl ₂	7	7-8	- 0,5 mM CaCl ₂	stärker exprimiert	
	stärker exprimiert			16	8
	40-45	4-5		17	5
	50-78	5-6		20	8
	schwächer exprimiert			45	8
---	---	schwächer exprimiert		---	---

3.1.6 Charakterisierung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände mit Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie

In der Gelchromatographie der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten jeweils zwei Peaks mit Retentionszeiten von 41-42 und 60-62 Minuten detektiert werden (Abb. 13 A und C), die getrennt voneinander in zwei Fraktionen aufgefangen worden sind. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend mit der SpeedVac für Dünnschichtchromatographie-Analysen wieder auf ca. 150 µl eingengt, bzw. unverdünnt für Hemmhofstests eingesetzt. Die Retentionszeiten und Volumina der einzelnen Peaks/Fraktionen sind zusätzlich aus Tabelle 8 zu entnehmen.

Werden *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ angezogen, so kann in der niedermolekularen Fraktion dieser Wachstumsüberstände für beide Proben nur noch ein Peak mit einer Retentionszeit von 59-60 Minuten detektiert werden, während der erste Peak, der sonst mit einer Retentionszeit von 41-42 Minuten gezeigt werden konnte, vollständig fehlte (Tabelle 8, Abb. 13 B und D).

Tab. 8 Retentionszeiten der Peaks bzw. Fraktionen aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mit destilliertem Wasser als Laufmittel. Die niedermolekulare Fraktion stammte aus Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose und otional mit 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren.

	Peak	M9	M9 + 0,2 mM FeCl ₃
Retentionszeit (Min) [Volumen/ml]			
<i>P. fluorescens</i> A506	1	41 [25]	---
	2	62 [50]	60 [46]
<i>P. fluorescens</i> Bk3	1	42 [23]	---
	2	60 [46]	59 [24]

Sowohl in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 als auch der von Bk3 wird nach ca. 41-42 Minuten bzw. nach ca. 60-62 Minuten eine Substanz oder ein Substanzgemisch von der Gelfiltrationssäule eluiert. Die Intensität des ersten Peaks ist dabei deutlich geringer als die des zweiten. Gleichzeitig ist die Intensität beider Peaks bei *P. fluorescens* A506 deutlich größer als bei *P. fluorescens* Bk3 (ca. 20% bei Peak 1 und ca. 26% bei Peak 2).

Bei Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ fehlt in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände bei beiden Stämmen Peak 1. Es wird demnach ein reduziertes Spektrum niedermolekularer Substanzen sekretiert. Die Anwesenheit der Eisenionen führte vermutlich zu einer veränderten Sekretion von niedermolekularen Bestandteilen.

Alle Peaks wurden für Dünnschichtchromatographie-Analysen aufgefangen und mit der SpeedVac auf ca. 150 µl eingengt. Für Proben, die in Gegenwart von FeCl₃ angezogen worden waren und bei denen Peak 1 fehlte, wurde auch die von der Gelfiltrationssäule kommende Fraktion von Minute 35-45 aufgefangen (was der Gesamt-Retentionszeit von Peak 1 entsprechen würde). Auch diese wurde mittels SpeedVac auf ca. 150 µl ankonzentriert und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

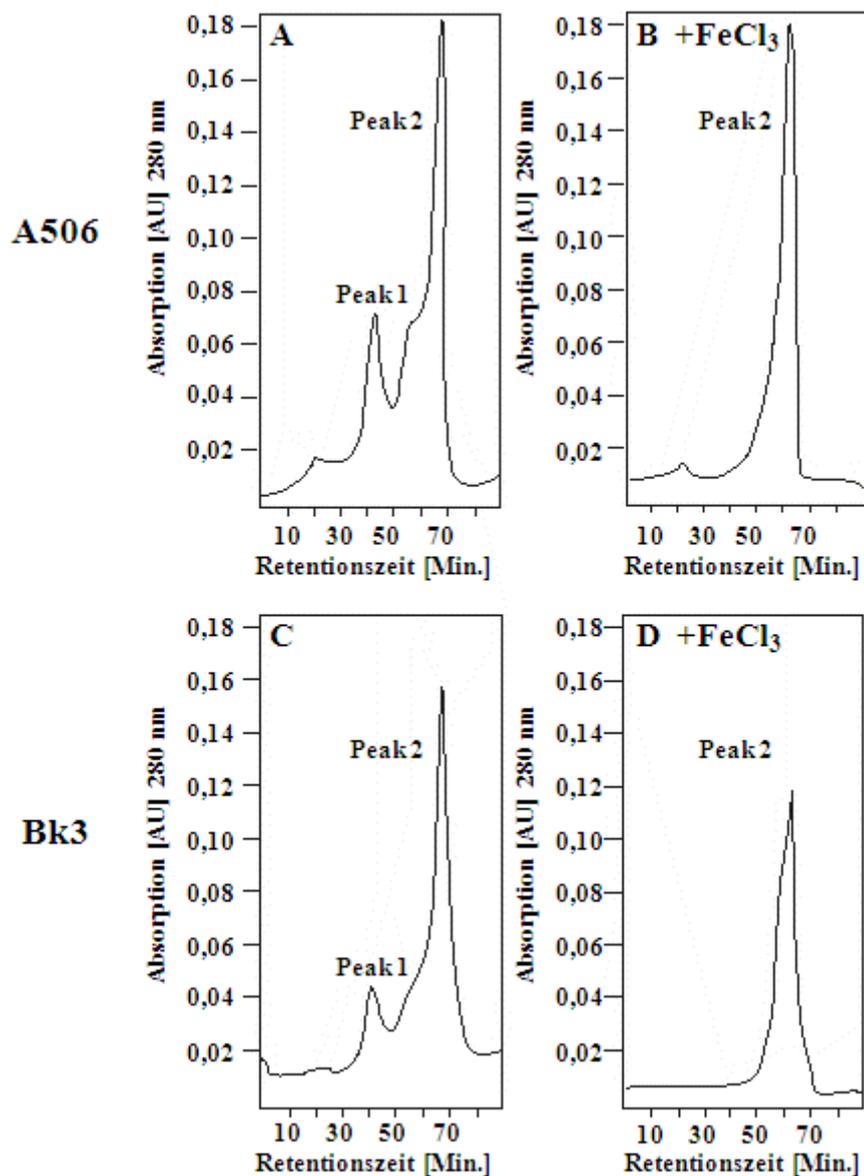


Abb. 13 Chromatogramme der Gelfiltrationen von den niedermolekularen Fraktionen (< 5 kDa) der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3. **A und C** Niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. **B und D** Niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bei Anzucht der Bakterien in M9-Medium mit 10 mM Asparagin, 0,5% Glukose und 0,2 mM FeCl₃. Als Proben dienten jeweils 30 ml der niedermolekularen Fraktion, die auf 1,5 ml mit der SpeedVac bei 45°C ankonzentriert worden war. Laufmittel: destilliertes Wasser, Detektion mit UV-Licht (280 nm, ABS-Range 0,2).

Sowohl Peak 1 als auch Peak 2 zeigten in Hemmhofstests auf Minimalmedium eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE, bei denen die Ausbildung lytischer Zonen, wie bereits unter 3.1.3 beschrieben wurde, beobachtet werden konnte (keine Abb. gezeigt). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 mindestens zwei oder mehr verschiedene Komponenten enthält, die *E. amylovora* 222::TnluxCDABE hemmen können und die sich bei einer Gelfiltration unter den gewählten Bedingungen in zwei Fraktionen auftrennen lassen.

In Peak 1 von *P. fluorescens* A506 konnten mittels Dünnschichtchromatographie zwei voneinander abgegrenzte Spots mit blau-grüner Fluoreszenz sowie ein Spot mit oranger

Fluoreszenz unter UV-Licht mit RF-Werten zwischen 0,02 und 0,34 detektiert werden. Für Peak 1 von *P. fluorescens* Bk3 wurden drei Spots mit derselben Fluoreszenz und RFs zwischen 0,02 und 0,24 beobachtet. Alle Spots aus Peak 1 waren mit Ninhydrin anfärbbar und zeigten eine violette oder orange-gelbe Färbung, was auf das Vorhandensein primärer und sekundärer Amine hinweist. Eine Anfärbung der Spots aus Peak 1 mit Eisen-Reagenz war nicht möglich.

In Peak 2 von *P. fluorescens* A506 wurden vorwiegend Spots mit violetter Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert, während ein Spot eine orange Fluoreszenz aufwies. Die RF-Werte lagen hier zwischen 0,73 und 0,90. Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 bestand hingegen aus einem Spot mit violetter Fluoreszenz, zwei Spots mit blauer und einem Spot mit oranger Fluoreszenz unter UV-Licht. Die RF-Werte lagen hier zwischen 0,56 und 0,88. Keiner der Spots aus Peak 2 konnte mit Ninhydrin gefärbt werden, allerdings zeigten alle violetten Spots aus Peak 2 von *P. fluorescens* A506 eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Violett-färbung nach Behandlung mit Eisen-Reagenz, wobei der oberste (RF-Wert 0,90) die intensivste Färbung aufwies.

Zusätzlich zu den Proben aus der Gelfiltration wurde ein Salizylsäure-Standard (1% Salizylsäure in 96% Ethanol, 7 µl) mit aufgetragen. Der Salizylsäurestandard zeigte ebenfalls eine ausgeprägte violette Fluoreszenz unter UV-Licht, eine violette Färbung nach Behandlung mit Eisen-Reagenz sowie einen RF-Wert von 0,9. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 Salizylsäure enthält.

Aus Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 konnte keiner der Spots mit Eisen-Reagenz angefärbt werden. Der oberste, violette Spot wies mit 0,88 nahezu denselben RF-Wert auf wie der Salizylsäurestandard, dennoch konnte für diese Probe Salizylsäure nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Bei Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ konnten in der Fraktion, die Peak 1 entsprochen hätte, keine Spots mehr nachgewiesen werden. In Peak 2 fehlte jeweils der oberste Spot, der bei *P. fluorescens* A506 Salizylsäure entspricht.

Alle Informationen zu den in der Dünnschichtchromatographie detektierten Spots sind nachfolgend in Tabelle 9 zu finden.

Tab. 9 Fluoreszenzfärbung unter UV-Licht, RF-Werte und Ergebnisse der Anfärbung von Spots, die mittels DC detektiert wurden. Die Fluoreszenz wurde mittels eines UV-Tisches (312 nm) detektiert. Die Färbungen wurden mit Ninhydrin zur Detektion primärer und sekundärer Amine und mit Eisen-Reagenz zur Detektion von Salizylsäure durchgeführt. Die Proben für die DC stammen aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktion von Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3, die in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose, sowie optional mit 0,2 mM FeCl₃ angezogen worden waren. + = positive Färbung, - = keine Färbung, +/- = schwache Färbung

	<u><i>P. fluorescens</i> A506 Peak 1</u>						<u><i>P. fluorescens</i> Bk3 Peak 1</u>					
				+ FeCl ₃						+ FeCl ₃		
Spot	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
RF-Wert	0,02	0,13	0,34	---	---	---	0,02	0,08	0,24	---	---	---
Fluoreszenzfärbung	blau-grün	blau-grün	orange	---	---	---	blau-grün	blau-grün	orange	---	---	---
Ninhydrin-Färbung	+	+	+	---	---	---	+	+	+	---	---	---
Eisen-Reagenz-Färbung	-	-	-	---	---	---	-	-	-	---	---	---

	<u><i>P. fluorescens</i> A506 Peak 2</u>					<u><i>P. fluorescens</i> Bk3 Peak 2</u>					Salizylsäure			
					+ FeCl ₃							+ FeCl ₃		
Spot	#1	#2	#3	#4	#1	#2	#1	#2	#3	#4	#1	#2	#3	
RF-Wert	0,73	0,79	0,87	0,90	0,66	0,79	0,56	0,66	0,74	0,88	0,45	0,49	0,63	0,90
Fluoreszenzfärbung	orange	violett	violett	violett	violett	violett	orange	blau	blau	violett	orange	blau	blau	violett
Ninhydrin-Färbung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eisen-Reagenz-Färbung	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Eine der wesentlichen Charakteristika von *P. fluorescens* Stämmen ist die Produktion von Pyoverdinen (Varma und Chincholkar 2007). Pyoverdine gehören zu den Siderophoren, hierbei handelt es sich um Verbindungen mit einem niedrigen Molekulargewicht und einem spezifischen Eisen-Liganden. Unter UV-Licht (312 nm) zeigen sie eine grün-blaue Fluoreszenz; damit können sie zuverlässig auf King's B Medium detektiert werden (Höfte et al. 1992, King et al. 1954, Varma und Chincholkar 2007).

Pyoverdine bestehen aus einem Dihydroxychinolin-Chromatophor, das mit einer Peptidkette, bestehend aus sechs bis zwölf Aminosäuren, verbunden ist (Fernández et al. 2001).

Da die Konzentration an Eisen-Ionen in der Umwelt in den meisten Fällen limitiert ist, wird die Produktion von Pyoverdinen durch die gegebene Eisen-Konzentration reguliert. Sofern Eisen-supplementierende Bedingungen vorliegen, wird die Bildung von Pyoverdinen unterdrückt (Joyner und Lindow 2000, Meyer und Stinzi 1998, Rachid und Ahmed 2005).

Auf Grund ihrer Fluoreszenz-Farbe unter UV-Licht, dem positiven Ninhydrin-Farbstest, der auf das Vorliegen von primären und sekundären Aminen hinweist, sowie die Unterdrückung der blau-grünen Spots in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ im Kulturmedium ist es sehr wahrscheinlich, dass Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Pyoverdine beinhaltet, sowie Peak 2 zusätzlich eine Eisen-regulierte Komponente.

Gelfiltrationsfraktionen aus Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zeigten eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE unter *in vitro*-Bedingungen auf Minimalagar; bei Anzucht der Bakterien in Gegenwart von 0,2 mM FeCl₃ konnte aber weder Peak 1 noch eine Hemmung des Feuerbrandregers durch die niedermolekulare Fraktion gezeigt werden. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Pyoverdine von *P. fluorescens* A506 und Bk3 in die Inhibierung von *E. amylovora* 222 involviert sind.

Dieser Wirkmechanismus wäre insofern nicht unwahrscheinlich, da Eisen- was durch Siderophore der Zelle bereitgestellt wird- für zahlreiche Signal- und Stoffwechselprozesse benötigt wird. Eine Eisenlimitierung wirkt sich allgemein (und in diesem Fall für *E. amylovora* 222) wachstumshemmend aus (Expert, 1999).

In Peak 1 der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 konnten mittels Massenspektrometrie drei Hauptpeaks und drei Nebenpeaks detektiert werden. Mit Berücksichtigung der natürlichen Isotope (C12, C13 und C14) konnte ein einfaches Masse- zu Ladungsverhältnis gezeigt werden, d.h. es liegt eine einfache Protonierung der detektierten Substanzen vor. Die in den Abbildungen gezeigten Massenpeaks entsprechen damit also der Masse der Substanz +1. Nach Abzug von 1 ergeben sich damit für die Hauptpeaks gerundet Massen von 259, 497 und 735 Da.

Peak 1 von *P. fluorescens* Bk3 gleicht dem von *P. fluorescens* A506. Auch hier konnten drei Haupt- und zwei Nebenpeaks detektiert werden, wobei die Hauptpeaks denen von *P. fluorescens* A506 mit Massen von 260, 498 und 736 Da sehr ähnlich sind, wenn auch in jeden Massenpeak 1 Da mehr gemessen wurde.

Die Ergebnisse stimmen mit der Analyse der niedermolekularen Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie überein, wo in Peak 1 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 hauptsächlich jeweils drei Substanzen detektiert wurden, die unter UV-Licht dieselbe Fluoreszenz aufwiesen, aber teilweise voneinander abweichende RF-Werte.

In Peak 2 von *P. fluorescens* A506 konnten drei Haupt- und mehrere kleinere Peaks mittels MS detektiert werden. Wieder wurde nur eine einfache Protonierung der detektierten Substanzen festgestellt und es konnten Massen für die Hauptpeaks von 326, 350 und 366 ermittelt werden.

Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 ähnelt nur geringfügig dem von *P. fluorescens* A506. Zwar konnte auch hier ein Hauptpeak mit einer Masse von 325 Da gezeigt werden (bei *P.*

fluorescens A506 326 Da), ansonsten wurden neben mehreren kleineren Peaks zwei weitere Hauptpeaks mit Werten von 225 und 329 Da gezeigt. Insgesamt konnte für diese Probe nur eine eher geringe Teilchenzahl von $5,9 \times 10^4$ gemessen werden, so dass es sich bei kleineren Nebenpeaks möglicherweise nur um einen Hintergrund oder Verschmutzungen handelt.

In der Dünnschichtchromatographie konnte für Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 jeweils eine Substanz mit gleicher Fluoreszenz unter UV-Licht (violett) und sehr ähnlichem RF-Wert gezeigt werden, während die übrigen Spots eine im Verhältnis zueinander verschiedene Färbung unter UV-Licht zeigten bzw. deutlich unterschiedliche RF-Werte aufwiesen. Die Ergebnisse von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie passen somit zueinander.

Mittels Dünnschichtchromatographie-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 Salizylsäure beinhaltet, während für *P. fluorescens* Bk3 diese nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde ein Salizylsäurestandard (1% in Ethanol) mittels MS untersucht und die Ergebnisse mit denen von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 verglichen. Da die Hauptpeaks des Standards zwischen 320 und 350 Da lagen, wurde insbesondere dieser Bereich von Peak 2 von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gesondert betrachtet.

Die MS des Salizylsäure-Standards zeigte in diesem Bereich bei einfacher Protonierung Massenpeaks von 325, 327 und 329 Da. Für *P. fluorescens* A506 konnten Peaks mit Massen von 324, 326 und 328 Da detektiert werden; bei *P. fluorescens* Bk3 wurden Peaks mit Massen von 325, 327 und 329 gezeigt.

Das für den Standard gezeigte Muster ist demnach in der MS von Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3 wiederzufinden, bei *P. fluorescens* A506 lediglich mit jeweils 1 Da mehr Masse. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Peak 2 von *P. fluorescens* A506 tatsächlich Salizylsäure enthält (wie schon mittels Dünnschichtchromatographie gezeigt wurde), zusätzlich ebenso Peak 2 von *P. fluorescens* Bk3.

Alle aufgeführten Ergebnisse der MS sind nachfolgend in Tabelle 10 noch einmal aufgeführt.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 produzieren nachweislich durch Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie teilweise gleiche oder ähnliche extrazellulär vorliegende niedermolekulare Substanzen. Eine dieser Substanzen konnte im Vergleich zu Standards als Salizylsäure identifiziert werden. Zusätzlich konnten für beide Stämme niedermolekulare Substanzen in Peak 2 detektiert werden, die bei dem jeweils anderen Stamm nicht vorlagen.

Tabelle 10 Massenpeaks aus der MS von Peak 1 und Peak aus der Gelfiltration der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sowie dem Salizylsäurestandard (1% in 96% Ethanol). Die Wachstumsüberstände stammten von einer 3-tägigen Anzucht der Bakterien in 30 mL M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Die Gelfiltration fand mittels einer Sephadex G25-Säule und Wasser als Laufmittel statt. Die Peaks wurden aufgefangen, auf 150 µl eingengt und alle Proben 1:1 mit 100% Methanol (mit 2% Essigsäure) versetzt. Der Probenauftrag auf die MS betrug 5 µl/min, mit einer Ionisierungsenergie von 4,5 kV und einer Kapillartemperatur von 200°C. Die Messung erfolgte im positiven Modus. Übereinstimmungen der Peaks in Bezug auf die ermittelte Masse wurden durch graue Unterlegungen in verschiedenen Schattierungen gekennzeichnet.

	Hauptpeaks [m/z]			Nebenpeaks [m/z]				
Bereich 100-1000 [m/z]								
Peak 1 <i>P. fluorescens</i> A506	259	497	735	237	519	757		
Peak 1 <i>P. fluorescens</i> Bk3	260	498	736	130	260			
Peak 2 <i>P. fluorescens</i> A506	326	350	366	219	248	680	696	734
Peak 2 <i>P. fluorescens</i> Bk3	225	325	329	212	249	329	389	437
Bereich 320-350 [m/z]								
Salizylsäure-Standard	325	327	329					
Peak 2 <i>P. fluorescens</i> A506	324	326	328					
Peak 2 <i>P. fluorescens</i> Bk3	325	327	329					

Im Rahmen der Untersuchung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände mittels Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie konnte in 2. Peak aus der Gelfiltration von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 also Salizylsäure nachgewiesen werden. Inhibitorische Tests mit einer Konzentrationsreihe von 0-1% Salizylsäurelösung (in Wasser, pH 7,2) sollten klären, ob diese an der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beteiligt sein könnten. Die Hemmhofversuche wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt; von jeder Verdünnungsstufe der Salizylsäurelösungen wurden 40 µl eingesetzt.

Bei jeder Verdünnungsstufe konnte nach 24-48 Stunden die Ausbildung eines Hemmhofes, in dem kein Wachstum von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE beobachtet werden konnte, gezeigt werden, wobei die Ausprägung des Hemmhofes mit steigender Konzentration an Salizylsäure leicht zunahm (Abb. 14).

Eine Involvierung der von *P. fluorescens* A506 produzierten Salizylsäure in die Inhibierung des Feuerbrandregers ist damit wahrscheinlich.

Konzentration [%] Salizylsäure

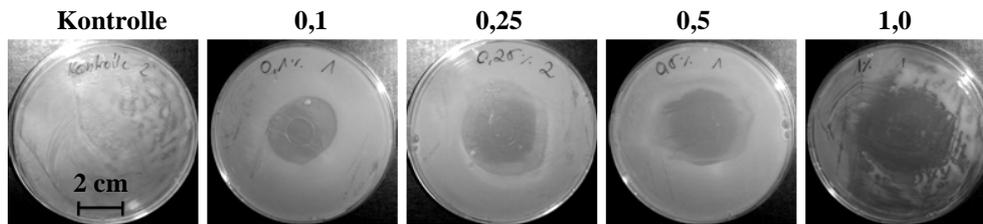


Abb. 14 Lichtbilder der Hemmhoftests auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Salizylsäure-Konzentrationen (in Wasser, pH 7,2) nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Auf jede Platte wurden 9×10^7 Zellen ($100 \mu\text{l}$ in dest. Wasser) von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE ausplattiert. Mittig gespottet wurden jeweils $40 \mu\text{l}$ der einzelnen Konzentrationsstufen an Salizylsäure. Kontrolle ohne Salizylsäure.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch die zusätzliche Supplementierung des Minimalmediums mit verschiedenen Konzentrationen an FeCl_3 aufgehoben werden kann.

Das Minimalmedium wurde mit $145 \mu\text{M/ml}$ Salizylsäure versetzt (in Wasser, pH 7,2, entspricht der 0,5%igen Lösung) und 0, 29, 72, 145 und $290 \mu\text{M}$ FeCl_3 zugegeben. Die inhibitorischen Tests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz Zugabe äquimolarer Mengen FeCl_3 die Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch Salizylsäure nicht vollständig aufgehoben werden konnte; immer noch konnte die Ausbildung lytischer Zonen gezeigt werden (keine Abb. gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass die inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE nicht alleine auf die Eigenschaft von Salizylsäure als Siderophor, also als Eisen-rekrutierendes Molekül zurückzuführen sind, sondern hier auch eine allgemein antimikrobielle Eigenschaft eine Rolle spielen muss.

3.1.6 Biologische Kontrolle von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox

Ausschließlich mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE infizierte Blüten zeigten bereits 24 Stunden nach Infektion eine braun-schwarze Verfärbung des Stempels, die sich bis zum dritten Tag nach der Infektion ausbreitete (Abb. 15 A). Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox, die mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 vorbehandelt wurden, blieben nach Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE symptomfrei (Abb. 15 B), nur eine Blüte zeigte die braun-schwarze Verfärbung des Stempels (keine Abb. gezeigt). Blüten, die mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 vorbehandelt worden waren, blieben ebenfalls nach Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE symptomfrei (siehe Abb. 15 C); nur eine Blüte zeigte schwache Symptome mit einem leicht braun verfärbten Stempel (keine Abb. gezeigt).

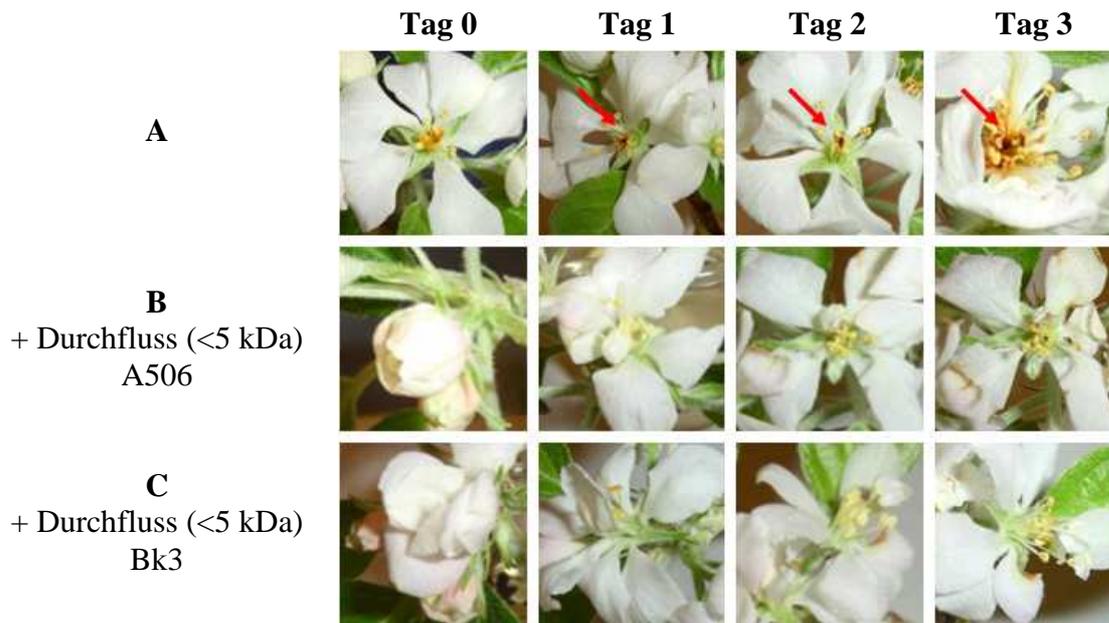


Abb. 15 Lichtbilder der Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox nach Infektion mit 3×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium) von Tag 0-3. **A** Keine Vorbehandlung der Blüten. **B** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 (100 μ l/Blüte). **C** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 (100 μ l/Blüte). Die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zur Gewinnung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose.

Im Gegensatz zu den oben gezeigten Lichtbildern konnte *E. amylovora* 222::TnluxCDABE mittels Biolumineszenzmessung an allen Versuchstagen auf allen Blüten nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob diese mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 vorbehandelt worden waren oder nicht (Abb. 16).

Auf Grund einer geringen Anzahl von Blüten, die für diesen Vorversuch zur Verfügung standen, können noch keine detaillierte Auswertung erfolgen, sondern lediglich erste Aussagen getroffen werden. Es wurde gezeigt, dass die hier untersuchten Blüten in Gegenwart der niedermolekularen Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine nahezu fehlende Krankheitssymptomatik im Vergleich zu Blüten, die nur mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE infiziert worden waren, zeigten.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kontrolle von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch diese niedermolekulare Fraktion möglich ist, auch wenn sie unter Umständen nicht zu einer Inaktivierung des autobiolumineszenten Feuerbranderreger führt, sondern nur verhindert, dass ein Eindringen in die Blüte erfolgt.

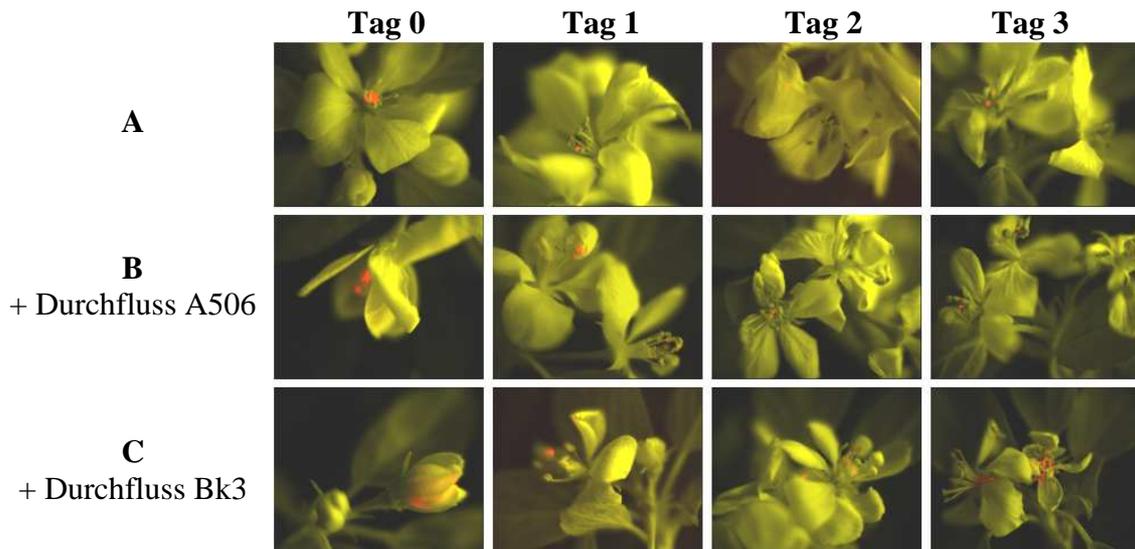


Abb. 16 Messung der Biolumineszenz von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox von Tag 0-3 nach Infektion mit 3×10^7 Zellen *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (in LB-Medium). **A** Keine Vorbehandlung der Blüten. **B** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* A506 (100 μ l/Blüte). **C** Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion des Wachstumsüberstandes von *P. fluorescens* Bk3 (100 μ l/Blüte). Die Anzucht von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zur Gewinnung der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände erfolgte in M9-Medium mit 10 mM Asparagin und 0,5% Glukose. Jedes Bild besteht aus der Überlagerung des Lichtbildes (gelb, 1 msec, Gain 3, Binning 4 x 4) mit dem Biolumineszenzbild (rot, 10 sec, Gain 3, Binning 4 x 4).

3.1.7 Kontrollkapazität der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände sowie von Salizylsäure in „Pear Slice Assays“

Mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE inokulierte Birnenscheiben beider Kultivare (Conference und Vereinsdechant) zeigten nach 48 Stunden eine durch das Pathogen bedingte deutliche Schleim- und Tröpfchenbildung.

Bei einer Vorbehandlung der Birnenscheiben mit den Wachstumsüberständen von *P. fluorescens* A506 und Bk3 konnte zwar immer noch nach 48 Stunden eine Schleimbildung beobachtet werden, dennoch fiel diese im Vergleich zu nur mit Wasser vorbehandelten und anschließend mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE inokulierten Scheiben etwas geringer aus (siehe Abbildung 17). Eine Supplementierung der Wachstumsüberstände mit 0,1% Tween20, was eine bessere Oberflächenbenetzung ermöglichen sollte, führte zu keiner eindeutigen Verbesserung dieser Ergebnisse (keine Abbildungen gezeigt). Möglicherweise zeigen die Wachstumsüberstände tatsächlich nur unter minimalen Wachstumsbedingungen (Minimalagar) ihre eindeutige und starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber dem Feuerbranderreger.

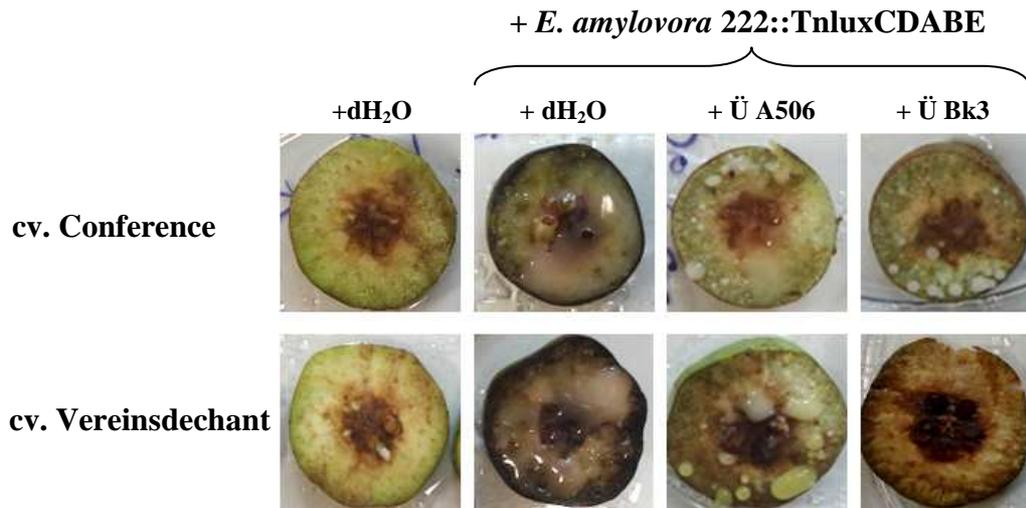


Abb. 17 Lichtbilder des „Pear Slide Assays“ 48 Stunden nach Inokulation mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Birnenscheiben der Kultivare *P. communis* Conference bzw. Vereinsdechant (Feuerbrand-suszeptibel) wurden mit sterilem destilliertem Wasser (dH₂O; mit 0,1% Tween20) bzw. Wachstumsüberständen (Ü) von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eingesprüht, anschließend durch Besprühen mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE (1×10^8 Zellen/ml in sterilem destilliertem Wasser) inokuliert.

Bei einer Vorbehandlung der Birnenscheiben mit Salizylsäure konnte ab einer Konzentration von 0,5% (mit 0,1% Tween20) eine starke Hemmung des Feuerbranderreger mit einer nahezu ausbleibenden Entwicklung einer Symptomentwicklung beobachtet werden (siehe Abbildung 18). Die zuvor im Hemmhofstest gezeigte deutlich inhibitorische Wirkung von Salizylsäure auf das Feuerbrand-Pathogen konnte demnach auch auf Versuche mit Früchten übertragen werden. Allerdings führte Salizylsäure ab einer Konzentration von 0,5% zu einer etwas stärkeren Verbräunung der Birnenscheiben im Vergleich zu einer Wasser-behandelten Kontrolle (mit 0,1% Tween20; keine zusätzliche Abb. gezeigt).

Neben Salizylsäure konnte eine starke inhibitorische Wirksamkeit auch durch Vorbehandlung der Birnenscheiben mit dem Eisenchelator 1,10-Phenanthrolin in einer Konzentration von 0,25% gezeigt werden. Vorbehandelte Birnenscheiben der Kultivare Conference und Vereinsdechant zeigten kaum Symptome einer Feuerbrandinfektion, die Kombination dieses Reagenz mit Salizylsäure (ab einer Konzentration von 0,1-0,25%) führte zu einer vollständigen Unterdrückung der Feuerbrandsymptomatik nach 48 Stunden (siehe Abbildung 19).

Die zuvor gezeigte Verbräunung der Birnenscheiben nach Vorbehandlung mit Salizylsäure (ab einer Konzentration von 0,5%) viel bei diesen Ansätzen deutlich geringer aus. Die Kontrolle von *E. amylovora* ist auf Scheiben der anfälligen Birnenkultivare Conference und Vereinsdechant unter Einsatz einer Kombination aus einem Eisenchelator und der allgemein antimikrobiell wirksamen Salizylsäure demnach gut möglich, ohne sich dabei negativ auf die Birnenscheiben auszuwirken.

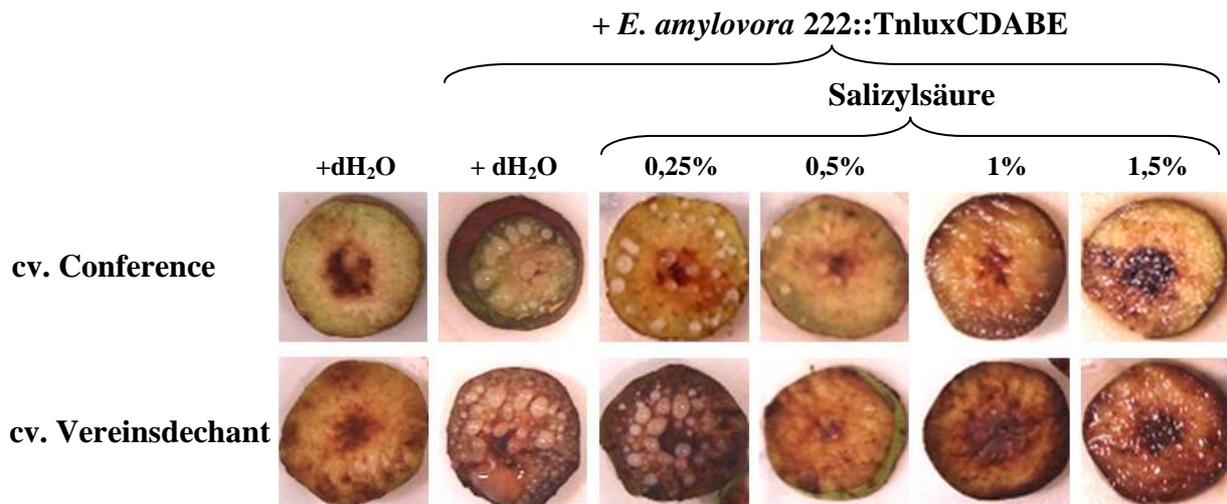


Abb. 18 Lichtbilder des „Pear Slide Assays“ 48 Stunden nach Inokulation mit *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE*. Birnenscheiben der Kultivare *P. communis* Conference bzw. Vereinsdechant (Feuerbrand-suszeptibel) wurden mit sterilem destilliertem Wasser (dH₂O; mit 0,1% Tween20) bzw. 0,25-1,5% Salizylsäure (in Wasser, mit 0,1% Tween20, pH 7) eingesprüht, anschließend durch Besprühen mit *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* (1x10⁸ Zellen/ml in sterilem destilliertem Wasser) inokuliert.

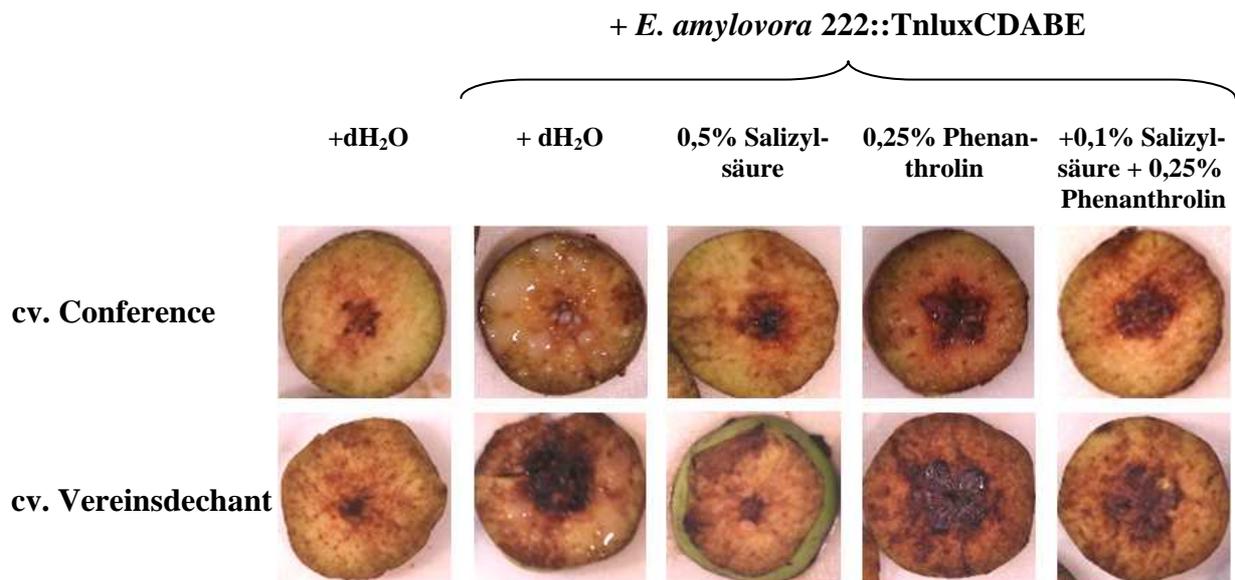


Abb. 19 Lichtbilder des „Pear Slide Assays“ 48 Stunden nach Inokulation mit *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE*. Birnenscheiben der Kultivare *P. communis* Conference bzw. Vereinsdechant (Feuerbrand-suszeptibel) wurden mit sterilem destilliertem Wasser (dH₂O; mit 0,1% Tween20), 0,5% Salizylsäure, 0,25% 1,10-Phenanthrolin oder 0,1% Salizylsäure + 0,25% 1,10-Phenanthrolin (jeweils in Wasser, mit 0,1% Tween20, pH 7) eingesprüht, anschließend durch Besprühen mit *E. amylovora* 222::*TnluxCDABE* (1x10⁸ Zellen/ml in sterilem destilliertem Wasser) inokuliert.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Zentrum der Untersuchungen lag die Identifizierung der Wirkmechanismen der mikrobiellen Antagonisten *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

Für die Hefestämme *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte nur eine inhibitorische Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger bei Dual Culture Tests mit ganzen Zellen gezeigt werden, aber keine Hemmung durch sekretierte extrazelluläre Komponenten.

Da die Hefen in der Lage sind, Kulturmedien anzusäuern, ist eine Verschiebung des pH-Wertes in einen Bereich, in dem der Feuerbranderreger nicht mehr wachsen kann, als Wirkmechanismus am wahrscheinlichsten, was durch Versuche mit gepufferten Medien bestätigt wurde.

Eine Detektion von Komponenten mit inhibitorischer Wirkung auf den Feuerbranderreger durch *A. pullulans* CF10 und CF40 konnte nicht festgestellt werden.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 konnten *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Dual Culture Test auf LB-Medium komplett unterdrücken. Auf Minimalmedium wurde eine ausgeprägte Hemmhofbildung um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gezeigt. Außerdem konnte durch isolierte extrazelluläre hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zusätzlich mindestens auf Minimalmedium eine eindeutige Hemmung des biolumineszenten Feuerbranderregers gezeigt werden. Daraus folgt, dass *P. fluorescens* A506 und Bk3 hoch- und niedermolekulare Substanzen mit inhibitorischem Effekt auf *E. amylovora* 222 in ihren Wachstumsüberstand sekretieren.

Auf den Feuerbranderreger inhibitorisch wirksame Komponenten in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten mit Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert und teilweise identifiziert werden. Pyoverdine und Salizylsäure sind nach den Ergebnissen dieser Analysen an der Inhibierung des Feuerbranderregers beteiligt; zudem konnte ein Salizylsäure-Standard unter *in vitro*-Bedingungen auf Minimalmedium ebenfalls *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stark hemmen.

Da sowohl Pyoverdine als auch Salizylsäure Eisen komplexieren können, ist eine Konkurrenz um Eisen möglicherweise ein wesentliches antagonistisches Wirkprinzip von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Salizylsäure zeigte allerdings zusätzlich auch bei ausreichender Eisen-Supplementierung eine bakterizide Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger. Eine direkte Inhibierung von *E. amylovora* durch Siderophore oder Salizylsäure ist in der Literatur bislang noch nicht beschrieben worden.

An dieser Stelle steht die Frage, ob die inhibitorisch wirksamen Komponenten auch unter Freilandbedingungen eine Infektion mit dem Feuerbranderreger erfolgreich und ausreichend kontrollieren können. Eine Vorbehandlung von Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox (Pathogen-suszeptibel) mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände vor Infektion mit *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigte, dass auf vorbehandelten Blüten im Gegensatz zu ausschließlich infizierten Blüten keine Entwicklung einer Feuerbrand-Symptomatik zu beobachten war. Ebenso konnte im Pear Slide Assay mit den Birnenkultivaren Conference und Vereinsdechant gezeigt werden, dass Salizylsäure (die im Wachstumsüberstand von *P. fluorescens* A506 und Bk3 vorliegt) oder 1,10-Phenanthrolin (das wie Pyoverdin ein Eisenchelator ist) die Symptomentwicklung einer Feuerbrandinfektion auf unreifen Birnen vollständig unterdrücken kann.

Bei ebenso erfolgreicher Bekämpfung des Feuerbranderregers im Freiland durch den Einsatz von aufgereinigten Pyoverdinen, Salizylsäure und vielleicht in Kombination mit anderen Eisen-komplexierenden Verbindungen wie 1,10-Phenanthrolin könnten diese ein vielversprechender Ansatz für eine neue Strategie bei der Kontrolle von Feuerbrand sein. Salizylsäure als Komponente der niedermolekularen Fraktion hätte hier neben der direkten inhibitorischen Wirkung auf *E. amylovora* insbesondere deswegen großes Potential, da die Säure bereits mehrfach als Induktor der Pflanzen-eigenen Abwehr gegen Phytopathogene beschrieben (systemic acquired resistance) wurde (Komjanc et al., 1999; Maurhofer et al., 1998; Saikia et al., 2003).

4. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Im Zentrum der Untersuchungen lag die Identifizierung der Wirkmechanismen der mikrobiellen Antagonisten *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 sowie *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3.

Für die Hefestämme *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 konnte nur eine inhibitorische Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbranderreger bei Dual Culture Tests mit ganzen Zellen gezeigt werden, aber keine Hemmung durch sekretierte extrazelluläre Komponenten.

Die Arbeit von McCormack et al. (1994) konnte zwar die Anwesenheit inhibitorisch wirksamer Moleküle, produziert durch die *A. pullulans*-Stämme Y5, Y60 und Y129 bestätigen. Der Charakter dieser Moleküle, die sich inhibitorisch auf *P. fluorescens* und *Staphylococcus aureus* in Bioassays auswirkten, ist aber nicht näher beschrieben worden. Zwar ist bekannt, dass *A. pullulans*-Stämme extrazelluläre Enzyme wie Amylasen, Proteinasen, Lipasen, Zellulasen, Xylanasen und Mannanasen produzieren (Chi et al., 2009), ein möglicher Zusammenhang dieser hydrolytischen Enzyme mit dem Antagonismus der Hefen ist aber nicht geklärt.

A. pullulans CF10 und CF40 werden als Pflanzenstärkungsmittel unter dem Namen „Blossom-Protect fb“ von der Firma Bio-Ferm vermarktet, wobei die Formulierung einen Puffer enthält, der den pH auf 4,0 hält. Außerdem sind sowohl *A. pullulans* CF10 als auch CF40 in der Lage, Kulturmedien so anzusäuern, dass ein Wachstum von *E. amylovora* nicht möglich ist (Kunz, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass auf gepufferten Medien die Inhibierung des Feuerbranderregers durch die Hefen deutlich langsamer und weniger effektiv stattfindet als auf dem ungepufferten Medium NBS. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass der pH von NBS als Flüssigkulturmedium durch *A. pullulans* CF10 bzw. CF40 innerhalb von drei Tagen auf ca. pH 4 abgesenkt wird. Die Verschiebung des pH-Wertes in einen Bereich, in dem der Feuerbranderreger nicht mehr wachsen kann, ist demnach als Wirkmechanismus am wahrscheinlichsten.

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 konnten *E. amylovora* 222::TnluxCDABE im Dual Culture Test auf LB-Medium komplett unterdrücken. Auf Minimalmedium wurde eine ausgeprägte Hemmhofbildung um die Kolonien von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gezeigt. Außerdem konnte durch isolierte extrazelluläre hoch- und niedermolekulare Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 zusätzlich mindestens auf Minimalmedium eine eindeutige Hemmung des biolumineszenten Feuerbranderregers gezeigt werden. Daraus folgt, dass *P. fluorescens* A506 und Bk3 hoch- und niedermolekulare Substanzen mit inhibitorischem Effekt auf *E. amylovora* 222 in ihren Wachstumsüberstand sekretieren.

Eine weitere Charakterisierung der hochmolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände mittels Protein-Gelelektrophorese zeigte zahlreiche Proteine, die möglicherweise in die Hemmung des Feuerbranderregers involviert sein könnten. Auch konnte gezeigt werden, dass *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 ein verändertes Proteinmuster in Gegenwart von *E. amylovora* 222 sekretieren. *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 können demnach auf die Gegenwart von *E. amylovora* 222 reagieren. Ob diese veränderten sekretierten Proteine direkt inhibitorisch auf den Feuerbranderreger wirken, ist aber ungeklärt.

Die Involvierung von Proteinen in die Hemmung von Pathogenen durch Antagonisten ist möglich und wurde bereits in der Literatur diskutiert.

Beispielsweise konnte für *B. cereus* 8A gezeigt werden, dass dieser Stamm ein Cerein produziert, das sich inhibitorisch auf *Listeria monocytogenes*, ein gram-positives, Lebensmittel-verderbendes Bakterium auswirkt (Bizani et al. 2005). Für einen anderen *Bacillus* Stamm (*myloliquefaciens*) konnte ein Bakteriozin nachgewiesen werden, dass in Agar-Diffusionsversuchen antimikrobiell gegenüber pathogenen oder Lebensmittel-verunreinigenden Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* and *Pasteurella haemolytica* wirkt (Lisboa et al., 2006).

P. fluorescens A506 bzw. Bk3 produzierten auf Minimalmedium Hemmhöfe, in denen zunächst ein schwaches Wachstum der Bakterien beobachtet werden, von denen der Feuerbranderreger aber nach 48 Stunden nicht mehr reisoliert werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine Lyse von *E. amylovora* 222 im Bereich der Hemmhöfe.

Die Freisetzung lytischer Enzyme durch antagonistisch wirksame Bakterien konnte zum Beispiel bereits für *P. fluorescens* PfMDU2 gezeigt werden, wo ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Produktion von β -1,3-Glukanase und der Hemmung des Pilzes *Rhizoctonia solani*, dem Erreger des Reis-Blattscheidenbrand, besteht (Nagarajkumar et al., 2004). Helistö et al. (2001) beschreiben sogar einen Komplex von Enzymen von *Bacillus* sp. X-b, der sich lytisch auf Zellwände der Holz-zerstörenden Basidiomyceten *Macrolepiota procera* und *Polyporus squamosus* auswirkt. Bei diesen Beispielen muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich um Antagonisten pilzlicher Pflanzenpathogene handelt und die hier beschriebenen inhibitorischen Wirkungen auf Grund struktureller Unterschiede wie bspw. dem Aufbau der Zellwand nicht direkt auf Bakterien übertragen werden können.

Zur Ermittlung der funktionellen Wirkkomponenten in den Fraktionen der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 und Bk3 wurde eine Transposon-vermittelte Mutagenese mit beiden Stämmen durchgeführt. Diese generierte Mutanten, die nur noch eine eingeschränkte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE bewirkten. Die Detektion des Integrationsortes ergab allerdings, dass keine extrazellulären Komponenten direkt von der Mutagenese betroffen gewesen sind, sondern vielmehr allgemeine Stoffwechselprozesse. Einige der generierten Mutanten zeigten dadurch in Voll- oder Minimalmedien zwar ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, konnten aber in Hemmhofversuchen auf Minimalmedium trotzdem den biolumineszenten Feuerbranderreger vergleichbar zum Wildtyp hemmen.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist eine reine Wachstumskonkurrenz, die häufig in Bezug auf Antagonismus durch *P. fluorescens*-Stämme vermutet wird, auszuschließen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bereits nach wenigen Stunden zu einem Zeitpunkt einsetzt, bei dem noch keine großen Unterschiede in der Zellzahl von Pathogen und Antagonist vorliegen.

Auf den Feuerbranderreger inhibitorisch wirksame Komponenten in der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 konnten hingegen mit Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert und

teilweise identifiziert werden. Pyoverdine und Salizylsäure sind nach den Ergebnissen dieser Analysen an der Inhibierung des Feuerbrandregers beteiligt; zudem konnte ein Salizylsäure-Standard unter *in vitro*-Bedingungen ebenfalls *E. amylovora* 222::TnluxCDABE stark hemmen.

Da sowohl Pyoverdine als auch Salizylsäure Eisen komplexieren können, ist eine Konkurrenz um Eisen möglicherweise ein wesentliches antagonistisches Wirkprinzip von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auf *E. amylovora* 222::TnluxCDABE. Salizylsäure zeigte allerdings zusätzlich auch bei ausreichender Eisen-Supplementierung eine bakterizide Wirkung auf den biolumineszenten Feuerbrandreger.

Ein Zusammenhang zwischen der Produktion von Siderophoren durch Pseudomonaden und dem Antagonismus gegenüber Pflanzenpathogenen konnte bereits dargestellt werden. *P. fluorescens* PFS6 produziert beispielsweise zwei verschiedene Siderophore, die sich inhibitorisch auf *E. carotovora* var. *carotovora*, dem Verursacher der Knollenfäule bei Kartoffeln, auswirkt (Helmy et al., 2008). Henry et al. (1991) zeigten, dass die Supplementierung des Kulturmediums mit FeCl₃ zu einem Verlust der antagonistischen Wirkung verschiedener *Pseudomonas* Stämme auf *P. tolaasii*, dem Verursacher von „bacterial blotch“, einer bakteriell bedingter Fleckenkrankheit bei Kulturpilzen, führt.

Im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Pflanzenpathogenen wird Salizylsäure allerdings eher als Induktor der systemic acquired resistance (SAR), also der pflanzen-eigenen Abwehr von Pathogenen, beschrieben. Die Behandlung beispielsweise von Tabakpflanzen mit *P. fluorescens* P3, einem Salizylsäure-produzierenden Stamm, induziert SAR genauso wie eine Behandlung von Kichererbsen-Pflanzen mit dem Stamm *P. fluorescens* Pf4-92, der ebenfalls ein Salizylsäure-Produzent ist (Maurhofer et al., 1998; Saikia et al., 2003). Eine mögliche Aktivierung der pflanzen-eigenen Pathogenabwehr von verschiedenen *M. domestica*-Kultivaren mittels einer Leucin-rich repeat (LRR) Rezeptor Protein-Kinase bei einer Infektion der Pflanze mit *V. inaequalis* oder durch Behandlung mit Salizylsäure ist ebenfalls bereits diskutiert worden (Komjanc et al., 1999).

Salizylsäure wird zusätzlich im Allgemeinen eine antimikrobielle Eigenschaft zugeschrieben. Anwendung findet sie beispielsweise bei der Behandlung von Hauterkrankungen (Hartmann, 1990) oder in der Geflügelindustrie (Hinton und Cason, 2007); auf Grund ihrer keratolytischen Eigenschaften (hornschichtlösend) kann sie abgestorbene Hautschichten ablösen und damit die Befallsdichte durch Bakterien auf der Haut vermindern. Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass die Säure die Produktion extrazellulärer Biofilme durch das Pathogen *S. epidermidis* vermindern kann (Teichberg et al., 1993).

Eine direkte Inhibierung von Phytopathogenen durch Salizylsäure ist in der Literatur allerdings kaum beschrieben.

Um genauer zu belegen, ob durch *P. fluorescens* A506 und Bk3 produziertes Pyoverdin und Salizylsäure tatsächlich hauptsächlich für den Antagonismus gegenüber *E. amylovora* verantwortlich sind, wäre es sinnvoll, die Synthese von Pyoverdinen und Salizylsäure durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 bspw. per Transposon-Mutagenese zu unterbinden und anschließend ihre Kontrollkapazität gegenüber *E. amylovora* 222 zu überprüfen.

Interessant wäre natürlich an dieser Stelle, ob die extrazellulären Komponenten von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 auch unter Freilandbedingungen und auf der Pflanze eine Infektion durch den Feuerbrandreger kontrollieren können. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der niedermolekularen Komponenten unter *in vivo* Bedingungen wurden Vorversuche mit Blüten von *M. domestica* cv. Holsteiner Cox sowie Pear Slide Assays mit *P.*

communis cvs. Conference und Vereinsdechant durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass eine Vorbehandlung der Blüten mit der niedermolekularen Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 eine Verhinderung einer Symptomentwicklung bewirken kann. Salizylsäure und der Eisenchelator 1,10-Phenanthrolin konnten zudem auf Birnen ebenso die Entwicklung einer Feuerbrandsymptomatik unterbinden.

Letztlich kann gesagt werden, dass bei der Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE durch *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 additive Effekte eine Rolle spielen. Zum einen zeigen die Antagonisten ein deutlich schnelleres und effektiveres Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen als der Feuerbranderreger, zum anderen sekretieren sie mehrere verschiedene hoch- und niedermolekulare Komponenten, die den biolumineszenten Feuerbranderreger hemmen. Diese additiven Effekte führen zu einem sehr effektiven Antagonismus gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zumindest unter *in vitro*-Bedingungen.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Der ursprüngliche Schwerpunkt der vorgesehenen Untersuchungen sollte auf die extrazelluläre Proteinfraction der gewählten Antagonisten *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 und *A. pullulans* CF10 und CF40 gelegt werden; inhibitorisch wirksame Proteine sollten aufgereinigt, identifiziert und ihr Kontrollkapazität gegenüber dem Feuerbranderreger auf Pflanzen untersucht werden.

Tatsächlich war eine Charakterisierung extrazellulärer Proteine schwierig. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass sich die hochmolekulare, proteinhaltige Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 deutlich hemmend auf den biolumineszenten Feuerbranderreger auswirkt und die Fraktion auch mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht wurde, so konnten keine einzelnen Proteine identifiziert werden, die für diese Hemmung verantwortlich sind. Bei Aufreinigungsversuchen (im Methodenteil nicht aufgeführt) ging die inhibitorische Wirkung dieser hochmolekularen Fraktion schnell verloren.

Aus diesem Grund wurde nach alternativen Ansätzen gesucht, die sich deutlich von der ursprünglichen Planung dieses Vorhabens unterschieden.

Transposon-Mutagenesen von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 sollten nach Möglichkeit Mutanten generieren, die ihre inhibitorische Wirksamkeit gegenüber *E. amylovora* 222::TnluxCDABE auf Grund einer Inaktivierung von Genen, die im direkten Zusammenhang mit dem Antagonismus stehen, verloren haben. Einige der durch die Mutagenese erzeugten Mutanten zeigten tatsächlich nur noch eine eingeschränkte Hemmung des Feuerbranderregers auf LB-Agar, sonderten jedoch auf Minimalagar immer noch Komponenten ab, die sich stark inhibitorisch auf den Feuerbranderreger auswirkten. Die Detektion des Integrationsortes des Transposons zeigte zudem, dass keine Gene extrazellulärer Komponenten mit möglicher inhibitorischer Wirkung durch die Mutagenese betroffen waren, sondern vielmehr allgemeine Stoffwechselprozesse.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde daraufhin auf die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gelegt, die auf Minimalagar eine ausgeprägte Hemmung von *E. amylovora* 222::TnluxCDABE zeigte. Wie ursprünglich für die

Proteinfraction geplant, wurden hier chromatographische Methoden sowie Massenspektrometrie zur Charakterisierung dieser Fraktion eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass die niedermolekulare Fraktion der Wachstumsüberstände von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 Salizylsäure sowie vermutlich Pyoverdin beinhaltet und dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen der Sekretion dieser Komponenten und der Hemmung des Feuerbranderregers besteht.

Insofern konnten tatsächlich als Ziel dieser Arbeit Komponenten identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für den Antagonismus von *P. fluorescens* A506 bzw. Bk3 gegenüber *E. amylovora* mit verantwortlich sind, wenn es sich auch um niedermolekulare Komponenten und nicht um Proteine handelt. Ausstehend ist hier noch die Beantwortung der Frage, ob diese Komponenten Feuerbrand auch auf Pflanzen unter Freilandbedingungen kontrollieren können; hier sind noch weiterführende Untersuchungen nötig.

6. Literaturverzeichnis

Agrios, G. N. (2005) Plant Pathology, 5th Edition, Harcourt Academic Press

Bericht über die Feuerbrandsituation (2003). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2003.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2004). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2004.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2005). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2005.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2006). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2006.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2007). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/BerichtFeuerbrandsituation2007.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2008). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Feuerbrandbericht2008.html

Bericht über die Feuerbrandsituation (2009). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Feuerbrandbericht2009.html

Bizani, D., Motta, A. S., Morrissy, J. A. C., Terra, R. M. S., Souto A. A. und Brandelli, A. (2005) Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. International Microbiology 8, 125-131

- Bogs, J., Bruchmüller I., Erbar, C. und Geider, K. (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology* 88, 416-421
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A. und Montesinos, E. (2007) Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology* 10, 123-132
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G. und Zhang, T. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 793-804
- Cirvilleri, G. und Caldarrera, G. (1998) Use of *lux*-marker genes to monitor survival of antagonistic *Pseudomonas fluorescens* on the phylloplane. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 441-451
- Dellagi, A., Brisset, M. N., Paulin, J. P. und Expert, D. (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 734-742
- Dubrac, S. und Touati, D. (2000) *Fur* positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: Functional analysis of the *sodB* promoter. *Journal of Bacteriology* 182, 3802-3808
- Eastgate, J. (2000) *Erwinia amylovora*: The molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology* 1, 325-329
- Expert, D. (1999) Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* ssp. and their host plants. *Annual Review of Phytopathology* 37, 307-334
- Feuerbrand-Strategie-Papier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (2008) Bekämpfung des Feuerbranderregers im Obstbau ohne Antibiotika. http://www.bmelv.de/cln_191/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Pflanze/Pflanzenschutz/Feuerbrand-Strategiepapier.html
- Fernández, D. U., Fuchs, R., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Munsch, P. und Meyer, J. M. (2001) The structure of a pyoverdine produced by a *Pseudomonas tolaasii*-like isolate. *Biometals* 14, 81-84
- Fernández-Pinas, F., Leganes, F. und Wolk, C. P. (2000) Bacterial *lux* genes as reporters in cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 305, 513-527
- Fernández-Pinas, F. und Wolk, C. P. (1994) Expression of *luxCDE* in *Anabaena* sp. can replace the use of exogenous aldehyde for *in vivo* localization of transcription by *luxAB*. *Gene* 150, 169-174
- Fiss, M. (2001) Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. Dissertation, Universität Hannover
- Gau, A. E., Koutb, M., Piotrowski, M., Kloppstech, K. (2004) Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv.

- Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *European Journal of Plant Pathology* 110, 703-711
- Geider, K. (1999) Interference of copper sulphate in growth of *Erwinia amylovora*. *Journal of Phytopathology* 147, 521-526
- Haas, D. und Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 4, 307-319
- Hartmann, H. H. (1990) The influence of various factors on the human resident skin flora. *Seminars in Dermatology* 9, 305-308
- Helistö, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A. und Korpela, T. (2001) Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components. *Journal of Chromatography B* 758, 197-205
- Helmy, M., Baddar, D. und El'Masry, M. H. (2008) Affinity purification of a siderophore that exhibits an antagonistic effect against soft rot bacterium. *Biochemistry Moscow* 7, 776-782
- Henry, M. B., Lynch, J. M. und Fermor, T. R. (1991) Role of siderophores in the biocontrol of *Pseudomonas tolaasii* by fluorescent pseudomonad antagonists. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 104-108
- Hinton, A. und Cason, J. A. (2007) Changes in the bacterial flora of skin of processed broiler chickens washed in solutions of salicylic acid. *International Journal of Poultry Science* 6, 960-966
- Höfte, M., Boelens, J. und Verstraete, W. (1992) Survival and root colonization of mutants of plant growth-promoting pseudomonads affected in siderophore biosynthesis or regulation of siderophore production. *Journal of Plant Nutrition* 15, 2253-2262
- Hossain, B. M., Lensing, J. und Gau, A. E. (2009) Inhibition of conidial growth of *Venturia inaequalis* by the extracellular protein fraction from the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3. *Biological Control* 48, 133-139
- Johnson, K. B. und Stockwell, V. O. (1998) Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology* 36, 227-248
- Joyner, D. C. und Lindow, S. E. (2000) Heterogeneity of iron bioavailability on plants assessed with a whole-cell GFP-based bacterial biosensor. *Microbiology* 146, 2435-2445
- Kavitha, K., Mathiyazhagan, S., Sendhilvel, A., Nakkeeran, S., Chandrasekar, G. und Fernando, W. G. D. (2005) Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 38, 69-76
- Kearns, L.P. und Mahanty, H.K. (1998) Antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh1087: Its role in inhibition of *Erwinia amylovora* and partial characterization of antibiotic biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1837-1844

- King, E. O., Ward, M. K. und Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307
- Komjanc, M., Festi, S., Rizzotti, L., Cattivelli, L., Cervone, F. und De Lorenzo, G. (1999) A leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (*LRPKm1*) gene is induced in *Malus domestica* by *Venturia inaequalis* infection and salicylic acid treatment. *Plant Molecular Biology* 40, 945-957
- Kürkcüoglu, S., Pietrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A. E. (2004) Up-regulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of *Malus domestica* cv. Holsteiner Cox after application of a non-pathogenic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3 to the plant phyllosphere. *Zeitschrift für Naturforschung* 59c, 843-848
- Kürkcüoglu, S. (2006) Eine Strategie zur biologischen Kontrolle von Pflanzenkrankheiten durch den Einsatz natürlicher, nicht-pathogener mikrobieller Antagonisten am Modellsystem *Malus domestica* (Apfel)/*Venturia inaequalis* (Apfelschorferreger)/*Pseudomonas fluorescens* Bk3 (mikrobieller Antagonist). Dissertation, Institut für Botanik, Universität Hannover
- Kunz, S. (2004) Development of “Blossom-Protect” – a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. 11th international conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture, Weinsberg, Fördergemeinschaft ökologischer Obstbau e.V., 108-114
- Kunz, S. (2005) Fire blight control in organic fruit growing – systematic investigation of the mode of action of potential control agents. In W. Zeller, C. Ullrich (eds): Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. Mitteilung der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 408, 249-253
- Kunz, S. und Haug, P. (2006) Development of a strategy for fire blight control in organic fruit growing. In: 12th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruitgrowing and viticulture. (eds.) FÖKO, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V., Weinsberg, 145-150
- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275
- Larsen, R. A., Wilson, M. M., Guss, A. M. und Metcalf, W. W. (2002) Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient
- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henrique, J. A. P. und Brandelli, A. (2006) Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus myloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International Microbiology* 9, 111-118
- Madigan, M. T. und Martinko, J. M. (2009) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 11. aktualisierte Auflage
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. und Défago, G. (1994) Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100, 221-232

- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. und Défago, G. (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88, 678-684
- McCormack, P. J., Wildman, H. G. und Jeffries, P. (1994) Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 927-931
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. und Jones, A. L. (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 40, 443-65
- Meyer, T. S. und Lambert, B. L. (1965) Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochimica et Biophysica Acta* 107, 144-145
- Meyer, J. M. und Stintzi, A. (1998) Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species. In: Montie, T. C., *Pseudomonas*. *Biotechnology Handbooks*, 10, 209-239 (Plenum Press, New York)
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. und Velazhahan, R. (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research* 159, 73-81
- Nesternko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 28, 239-242
- Norelli, J. L., Jones, A. L. und Aldwinckle, H. S. (2003) Fire blight management in the twenty-first century. *Plant Disease* 87, 756-765
- Oh, C. S. und Beer, S. V. (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253, 185-192
- Rachid, A. und Ahmed, B. (2005) Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology* 4, 697-702
- Saikia, R., Singh, T., Kumar, R., Srivastava, J., Srivastava, A. K., Singh, K. und Arora, D. K. (2003) Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Microbial Research* 158, 203-213
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379
- Schmoock, S. (2006) Infektion und Ausbreitung des Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* in An- und Abwesenheit des bakteriellen Antagonisten *Pseudomonas fluorescens* Bk3 auf verschiedenen Apfelnkultivaren. Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover

- Seibold, A., Fried, A., Kunz, A., Moltmann, E., Lange, E. und Jelkmann, W. (2005) Yeasts as antagonists against fireblight. EPPO Bulletin 34, 389-390
- Teichberg, S., Farber, B. F., Wolff, A. G. und Roberts, B. (1993) Salicylic acid decreases extracellular biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*: Electron microscopic analysis. The Journal of Infectious Diseases 167, 1501-1503
- Temple, T. N., Stockwell, V. O., Loper, J. E. und Johnson, K. B. (2004) Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple. Phytopathology 94, 1286-1294
- Unge, A., Tombolini, R., Mølbak, L. und Jansson, J. K. (1999) Simultaneous monitoring of cell number and metabolic activity of specific bacterial populations with a dual *gfp-luxAB* marker system. Applied and Environmental Microbiology 65, 813-821
- van der Zwet, T. (2002) Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae 590, 33-34
- Varma, A. und Chincholkar, S. (2007) Microbial siderophores. Serie: Soil Biology, Vol. 12. Springer Verlag, Berlin Heidelberg
- Velusamy, P. und Gnanamanickam, S. S. (2003) Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production by plant-associated bacteria and its role in suppression of rice bacterial blight in India. Current Science 85, 1270-1273
- Wilson, M. und Lindow, S. E. (1993) Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. Phytopathology 83, 117-123