

Abschlussbericht zum Forschungsauftrag

"Verbundvorhaben zur Bekämpfung des Feuerbranderregers im Obstbau ohne Antibiotika"

„Verbesserung und Verfeinerung von bestehenden computergestützten Prognosemodellen für den Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) unterstützt durch Untersuchungen zur Epidemiologie und Pathogenese des Erregers "

Aktenzeichen: 06HS037

**Universität Konstanz
Lehrstuhl Phytopathologie
Fachbereich Biologie
Universitätsstr. 10
78457 Konstanz**

**Prof. Dr. Ralf T. Vögele
Fachgebiet Phytopathologie
Fakultät Agrarwissenschaften
Universität Hohenheim
Otto-Sander-Str. 5
70599 Stuttgart**

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Hauptziel des Gesamtprojektes war die Erstellung verbesserter Programme zur Prognose von Blüten- und Triebinfektionen durch den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*, welche sowohl Berater als auch Obstbauern bedienen/auswerten können und welche für verschiedene Bekämpfungsverfahren und -mittel im integrierten und ökologischen Anbau bzw. Streuobstbau und bei unterschiedlich anfälligen Sorten geeignet sind. Die Anzahl an Spritzungen und die ausgebrachte Pflanzenschutzmittelmenge sollten damit reduziert und der Einsatz biologischer Präparate besser planbar werden. Hierzu sollte unser Forschungsprojekt die quantitative Erfassung des Erregers mittels Real Time PCR testen und etablieren. Ein weiteres Ziel des Forschungsprojektes war es ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Epidemiologie des Feuerbranderregers *E. amylovora* zu erhalten. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse bezüglich endo- und epiphytischer Besiedlung von Wirts- und Nichtwirtspflanzen sollten zusammen mit einer verbesserten Korrelation zu detaillierten Wetterdaten direkt in die Erstellung verbesserter Prognoseprogramme zur Vorhersage von Blüten- und

Triebinfektionen durch *E. amylovora* einfließen. Im Zuge dieser Untersuchungen sollten außerdem der Einfluss von Vektoren und Pflanzenschutzmassnahmen auf den Ausbreitungsverlauf des Bakteriums verfolgt, sowie das Augenmerk auf einen möglichst frühzeitigen Erregernachweis gelegt werden.

Planung und Ablauf des Projektes

Für die Projektlaufzeit vom 2007 bis 2010 waren für das Teilprojekt 06HS037 (Universität Konstanz) folgende Arbeitsschritte geplant:

- 1. Epidemiologie des Erregers.** Aufgrund des geringen Erkenntnisstandes über die Epidemiologie des Feuerbranderregerers sollten weitere Untersuchungen auf verschiedenen Organen von Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen sowohl im Feld als auch im Gewächshaus erfolgen.

- 2. Frühzeitiger Nachweis.** Um Obstanlagen vor Befall durch Feuerbrand zu schützen kommen verschiedene Prognosemodelle (Billing's Integrated System 95 - BIS 95 (Billing 1996, 1999), Maryblyt™ (Steiner 1990a, 1990b) und Cougarblight™ (Smith 1999) zum Einsatz, die anhand von Wetterdaten die Infizierbarkeit von Blüten errechnen. Diese Modelle beziehen den Erregerdruck einer Anlage jedoch nicht in ihre Berechnungen mit ein. Durch das Blütenmonitoring sollte *E. amylovora* frühzeitig und schnell in Anlagen nachgewiesen und so die Prognosemodelle verbessert werden. Durch optimierte Prognosen kann der Einsatz der gegen Feuerbrand eingesetzten Präparate auf ein Minimum reduziert werden, was zu einer Kostenreduzierung für den Landwirt und einer Entlastung der Umwelt führt.

- 3. Methodenvergleich.** Der Nachweis des Feuerbranderregerers in Umweltproben erfolgte am Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg - Außenstelle Stuttgart (LTZ-S) mittels einer von der EPPO validierten Nested-PCR (McManus und Jones 1995); an der Universität Konstanz hingegen mit der Real Time PCR (Salm und Geider 2004). Da ein Vergleich der Ergebnisse notwendig war, war auch ein Vergleich der Methoden hinsichtlich der Sensitivität unumgänglich.

- 4. Molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese.** Um die Bekämpfung des Feuerbrandes mit höchst möglicher Effizienz zu verfolgen, war es essentiell, den Ursprung und den Verlauf, also die Pathogenese, dieser Pflanzenkrankheit so gut wie möglich zu kennen. Endophytische Untersuchungen befallener Pflanzen sollten über die Migration des Erregers im Gewebe Aufschluss geben.

- 5. Verhalten auf Nichtwirtspflanzen.** Die Vermutung lag nahe, dass in einer Erwerbsanlage, in der Feuerbrand beobachtet wird, der Erreger auch außerhalb der Wirtspflanze zu finden ist. Die Rolle von Nichtwirtspflanzen in der Epidemiologie des Erregers und die Kenntnis über weitere Wirtspflanzen waren daher für eine nachhaltige Feuerbrandbekämpfung notwendig.

- 6. Verhalten an Vektoren.** Da die Ausbreitung durch Vektoren schnell und flächendeckend erfolgen kann, war es auch von Interesse mögliche Vektoren auf die Anwesenheit von *E. amylovora* hin zu testen, um so möglicherweise eine großflächigere Aussage über die Verteilung des Erregers zu erhalten, als sie durch die Blütenbeprobung möglich ist.

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Feuerbrand, verursacht durch das Gram-negative Bakterium *E. amylovora*, stellt weltweit die bedeutendste bakterielle Erkrankung des Kernobstes dar. Sie ist eine nicht regelmäßig, sondern sporadisch auftretende Krankheit, deren wirtschaftliche Folgen jedoch gravierend sein können. Daher ist eine zuverlässige Prognose zum zielgerichteten Einsatz der zur Verfügung stehenden Pflanzenschutzmittel und zur Vermeidung unnötiger Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln dringend erforderlich. Mit Hilfe von Prognosemodellen wird das Risiko für Infektionen unter bestimmten Umweltbedingungen mit möglichst hoher Präzision und Treffsicherheit abgeschätzt. Der wichtigste Infektionsweg des Feuerbrands ist die Blüteninfektion, an zweiter Stelle stehen die Triebinfektionen, Infektionen nach Hagel und der Unterlagenbefall. Als Prognosemodelle für Blüteninfektionen werden heute weltweit Billing's Integrated System 95 - BIS 95 (Billing 1996, 1999), Maryblyt™

(Steiner 1990a, 1990b) und Cougarblight™ (Smith 1999) eingesetzt. Alle drei Modelle sind im Wesentlichen empirisch entwickelt worden und basieren ausschließlich auf der Berechnung von Wetterdaten. Die Datenbasis beschränkt sich auf Höchst- und Tiefsttemperaturen und Niederschläge bzw. Tauereignisse eines Tages. Der tatsächliche Temperaturverlauf wird durch eine Sinuskurve simuliert (Baskerville und Emin 1969). Kontinuierlich ermittelte tatsächliche Stundenwerte gehen nicht ein. Dadurch wird relativ grob für einen einzelnen Tag und nicht differenziert für bestimmte Stunden ein Infektionsrisiko berechnet. Ausschließlich die Wetterdaten in der Blütezeit werden verwendet, nicht aber die der Vorblütezeit oder des Vorjahres, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass die primären Inokulumquellen bereits zu diesem Zeitpunkt aktiviert werden und das Auftreten von Blüteninfektionen beeinflussen. Von den phänologischen Daten werden lediglich der Blühbeginn und das Blühende berücksichtigt. Sortenunterschiede gehen nicht ein. Die Modelle BIS 95 und Maryblyt™ gehen davon aus, dass der Erreger in jedem Fall anwesend ist. Im Modell Cougarblight™ wird das lokale Inokulum anhand der Befallsgeschichte der Anlage abgeschätzt, aber nicht gemessen. Über die Gefahr von Triebinfektionen werden keine oder im Modell BIS 95 allenfalls grobe Aussagen gemacht. Weitere Prognosemodelle sind in der Literatur beschrieben, aber nicht weiter in der Praxis validiert worden.

Baden-Württemberg ist das Bundesland, das aufgrund seiner klimatischen und obstbaulichen Struktur am stärksten vom Feuerbrand betroffen ist. Das LTZ-S berechnet seit 1994 für die Obstbauregionen in Baden-Württemberg die Feuerbrandprognose, um Streptomycin-haltige Pflanzenschutzmittel zur Abwehr von Blüteninfektionen termingerecht zur Anwendung freigeben zu können. Diese offizielle Freigabe verhindert unnötige Anwendungen und beugt damit der Entwicklung von Resistenzen gegen den Wirkstoff vor. Sie ist deshalb Bestandteil der Genehmigung von Streptomycin nach dem Pflanzenschutzgesetz. Das LTZ-S hat 1994 zwei verschiedene Modelle, zunächst die Modelle Maryblyt™ und Billing's Revised System, in ein Computerprogramm, das Feuerbrandprogramm der LfP (jetzt LTZ-S) übertragen, 1997 das Billing's Revised System durch BIS 95 ersetzt, Maryblyt™ durch die Version 4.3 (Steiner und Lightner 1996) aktualisiert und beide Modelle leicht modifiziert (Moltmann 1996a, 1996b). Seit 1997 sind keine Änderungen mehr vorgenommen worden, um die Basis für die Warnung

konstant zu halten. Das Modell Cougarblight™ wird an der LTZ-S gesondert berechnet. Die Wetterdaten für das Programm werden von 60 - 80 Kleinmessstationen in den Obstanlagen des Landes verteilt erhoben. Dieses Messnetz wurde Anfang der neunziger Jahre aufgebaut und kontinuierlich erweitert. Die Wetterdaten liegen seither als Stundenwerte archiviert vor.

Die Erfahrungen mit dem Programm in den dem Projektstart vorangegangenen 14 Jahren hinsichtlich der Aussagekraft wurden festgehalten (Moltmann 1999, 2004, 2006). Alle drei Modelle berechnen nahezu dieselben Behandlungstermine. Eine weitere Optimierung erscheint daher mit der bisher verwendeten Datenbasis nicht möglich. Ungeklärt ist bei den jetzigen Modellen die Bedeutung von Niederschlag bzw. Tau. Eine Benetzung der Blüten ist nach Laborversuchen zur Biologie des Erregers zwar für eine Infektion erforderlich (Pusey 1997, 2000), in der Vergangenheit traten aber mehrfach Situationen auf, in denen es zu einer Infektion ohne ein gemessenes Nässeereignis kam. Die Taunässe wird im bisherigen Programm mittels Blattnässefühler und eines mehr oder weniger willkürlich gewählten Schwellenwerts ermittelt. Die Luftfeuchte geht in das Programm bisher nicht ein, obwohl sie eine im Gegensatz zur Blattnässe eichfähige meteorologische Messgröße ist. Das führt dazu, dass bei Überschreiten der Temperaturschwelle bereits ohne ein Nässeereignis gewarnt wird, was mitunter unnötige Anwendungen von Streptomycin zur Folge hat. Eine weitere Schwachstelle der Modelle sind die starren Temperaturschwellen, die nur eine Ja/Nein-Entscheidung erlauben. Praxisgerechter wäre die Angabe eines Bereiches mit abgestufter Infektionsgefahr.

Die Modelle sind über die Berechnung potentieller Infektionstage auf die Ausbringung eines direkt auf die Feuerbrandbakterien wirksamen Bakterizids wie Streptomycin ausgerichtet. Die Anwendungstermine biologischer Mittel liegen jedoch in Abhängigkeit von der Witterung mehr oder weniger weit vor einem potentiellen Infektionstag (Johnson et al. 2004). Mit einem verbesserten Programm sollte daher zusammen mit der Wettervorhersage und dem Verhalten der Antagonisten gegenüber der Witterung der optimale Ausbringungstermin auch für solche biologische Mittel zu bestimmen sein. In den USA wird zur Zeit ebenfalls an Verbesserungen der Prognosemodelle gearbeitet (H.S. Aldwinckle, pers. Mitteilung). Während der Projektlaufzeit veröffentlichte Ergebnisse werden in die

eigene Programmverbesserung einfließen, soweit sie für die hiesigen Verhältnisse verwertbar sind.

Der Feuerbrand trat in den letzten Jahren in Baden-Württemberg nicht mehr großflächig auf, wie es Mitte der 90er Jahre noch der Fall war, sondern verursachte nur noch lokal größere Schäden. Eine Ergänzung der Modelle um Informationen zum lokal vorhandenen Inokulum wäre daher wünschenswert. Da die Feuerbrandbakterien vor der Infektion der Blüte die Narbe besiedeln und sich dort auf hohe Zahlen vermehren, bietet sich die Untersuchung von Blütenproben an. Seit 2005 führt das LTZ-S ein landesweites Blütenmonitoring durch. Zusätzlich untersucht das LTZ-S an einem alten Befallsstandort (Schlat bei Göppingen) und in der Versuchsanlage Kirschgartshausen mögliche primäre Inokulumquellen sowie die Ausbreitung der Feuerbrandbakterien nach natürlicher bzw. künstlicher Inokulation. Als Nachweismethode wird die an der LTZ-S optimierte und etablierte molekularbiologische Nested-PCR Methode verwendet, die schnell und hochempfindlich ist. Die bisherigen Ergebnisse sind viel versprechend. Seit 2006 werden ähnliche Messungen auch von der Universität Konstanz (UKN) mit Hilfe eines mobilen Real Time PCR Gerätes im Rahmen eines von der BLE geförderten Projektes durchgeführt (Förderkennzeichen 04HS008). Hier werden verschiedene alte Befallsstandorte im Bodenseeraum, sowie die Versuchsanlage Karsee (2009 und 2010 Mühlingen) beprobt. Die Messungen im Bodenseeraum ergänzen die im Regierungsbezirk Stuttgart durchgeführten Untersuchungen und sollen besser aufeinander abgestimmt und um die Erfassung der epiphytischen Verbreitung von *E. amylovora* auf Nicht-Wirtspflanzen erweitert werden. Da eine Validierung der Methodik (Korrelation von epiphytischem Nachweis und tatsächlich auftretendem Befall) noch aussteht, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Einsatz der mobilen Real Time PCR in der obstbaulichen Praxis allerdings noch nicht flächendeckend möglich. Die Entwicklungen im Bereich des schnellen und empfindlichen Bakteriennachweises, lassen aber eine zukünftige Nutzung des Systems möglich erscheinen. Auf jeden Fall werden die Untersuchungen zum frühzeitigen Nachweis des Erregers auf der Blüte zu einem besseren Verständnis der Epidemiologie des Erregers beitragen.

Neben der Behandlung der Blüten mit Bakteriziden nach Prognosemodellen beruht die Strategie zur Bekämpfung von Feuerbrand derzeit auf dem

konsequenten Entfernen von befallenen Pflanzenteilen. Pflanzenteile mit sichtbaren Symptomen sollen das ganze Jahr über entfernt und verbrannt werden, um das Erregerpotential möglichst gering zu halten. Dabei sollen befallene Bäume bis weit ins gesunde Holz zurück geschnitten werden. Wenn der Stamm betroffen ist muss der Baum gerodet werden. Ein Unsicherheitsfaktor bei dieser Methode ist, dass bisher nicht bekannt ist, wie weit der Erreger über sichtbare Symptome hinaus bereits im Gewebe vorgedrungen ist. Häufig wird an sanierten Bäumen in den Folgejahren wieder starker Befall beobachtet. Daher ist anzunehmen, dass der Erreger über längere Zeit latent in der Pflanze überdauern kann und unter günstigen Bedingungen wieder massiv zu Symptomen führt. Völlig unklar ist dabei, ob latente Infektionen auch an Bäumen vorhanden sind, die noch nie Symptome gezeigt haben. Solche Bäume könnten als ständige Inokulumquelle unerkannt immer wieder zu Befall führen. Eine zuverlässige Aussage über eine mögliche latente endophytische Ausbreitung des Erregers in symptomfreien Gewebe ist daher dringend erforderlich.

Durch Pusey (2000) konnte gezeigt werden, dass sich *E. amylovora* auf den Narben, sowie dem Blütenboden vermehren und bei entsprechenden Temperaturen Populationen im Bereich von 10^5 - 10^8 Zellen erreichen kann. Auf anderen Blütenorganen des Apfels wurde bis zum Projektstart noch keine Vermehrung des Erregers beobachtet. Von Blattoberflächen konnte *E. amylovora* 24 Stunden bis fünf Tage nach Inokulation rückisoliert werden (Ockey und Thomson 2006; Thomson et al. 1975; van der Zwet und van Buskirk 1984). Eine Vermehrung auf Blättern konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Indizien sprechen allerdings dafür, dass sich der Feuerbranderreger in Mikronischen, wie der Basis glandulärer Trichome und Hydathoden, auf dem Blatt etablieren kann (Maas Geesteranus und de Vries 1984).

Der Feuerbranderreger wurde auch auf Blüten und anderen Pflanzenteilen von Pflanzenarten nachgewiesen, an denen eine Symptombildung bisher nicht beobachtet werden konnte (beispielsweise Löwenzahn und Kirsche; Dr. Moltmann, pers. Mitteilung). Die Arbeitsgruppe von Paulin (1981) konnte *E. amylovora* vom Herbst bis zur Birnenblüte im Frühjahr weder auf Unkräutern direkt unter infizierten Bäumen, noch auf Mais und *Actinidia* in der Nähe von erkrankten Pflanzen nachweisen. Eine größere Studie, in der Nichtwirtspflanzen auf ein

epiphytisches Vorkommen von *E. amylovora* hin untersucht wurden, wurde bislang nicht veröffentlicht. Eine epiphytische Ausbreitung der Bakterien auf Nicht-Wirtspflanzen könnte einen wesentlichen Beitrag zu einer Verbreitung des Erregers leisten. Bisher liegen keine Angaben darüber vor, ob und wie der Erreger sich auf diesen Pflanzen vermehrt und somit zum Aufbau eines hohen Inokulumpotentials beiträgt.

Das Vorkommen des Feuerbranderregeres auf Blüten-besuchenden Insekten gilt seit längerem als gesichert (van der Zwet und Keil 1979). Honig- und Wildbienen sind als mögliche Überträger des Feuerbranderregeres bereits bekannt (Johnson et al. 1993a, 1993b, Sabatini et al. 2006). Es soll daher weiter untersucht werden, in welchem Zeitraum der Erreger an Bienen oder anderen blütenbesuchenden Insekten nachgewiesen werden kann. Vor allem soll geklärt werden, ob der Erreger schon vor dem Auftreten von Symptomen und/oder nach dem Entfernen von Symptomen in einer Anlage an Insekten nachweisbar ist.

Das Programm des LTZ-S wurde an die Pflanzenschutzdienste anderer Bundesländer sowie des benachbarten Auslands (Österreich, Schweiz, Italien-Südtirol) weitergeben und wird dort insbesondere wegen seiner praktischen Anwendbarkeit für den Pflanzenschutzdienst seit Jahren erfolgreich genutzt (Marschall und Moltmann 2002). In einigen Bundesländern werden allerdings noch andere, weniger gut geprüfte und bewährte Programme für die Feuerbrandwarnung verwendet (BMVEL 2006). Das Programm kann derzeit allerdings nur von geschulten Beratern verwendet werden, da die Ausgabedatei Fachkenntnisse zur Interpretation erfordert. Ein auch für Nicht-Fachleute verständliches Ausgabeformat ist dringend erforderlich.

Ab Januar 2006 lief an der Universität Konstanz ein von der BLE gefördertes Projekt zur "Schnellen und sicheren Diagnose des Feuerbranderregeres *Erwinia amylovora* zur Optimierung von Bekämpfungsstrategien im Kernobstbau - Grundsätzliche Eignung der Real Time PCR zur Erweiterung witterungsgestützter Prognosemodelle" (Forschungsauftrag 04/HS008). Im ersten Förderungsjahr konnten in diesem Projekt bereits sehr interessante Erkenntnisse zu einem feldtauglichen Real Time PCR Nachweis von *E. amylovora* gewonnen werden. Dieses Projekt lieferte auch schon erste neue Daten zur Epidemiologie des

Feuerbrandenerregers und stellt die Basis für die geplanten Untersuchungen zur Epidemiologie und Pathogenese des Feuerbrandenerregers dar.

2. Material und Methoden

Real Time PCR Analysen wurden entweder mit einem SmartCycler II (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) oder mit einem CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad, München) ausgeführt. Der Schwellenwert wurde manuell auf 30 rfu (relative fluorescence unit), bzw. 250 rfu gesetzt, um die Analysen auf beiden Geräten vergleichbar zu machen. Als Real Time PCR Reaktionsmix wurde der QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) zusammen mit den Primern P29TF and P29TR (Salm and Geider 2004) eingesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 25 µl. Als maximales Probenvolumen konnten somit 10 µl eingesetzt werden. Das Real Time PCR Protokoll bestand aus seiner initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung 95°C, 10 sec und Annealing mit Extension bei 60°C für 30 sec. Jedem Real Time PCR Lauf folgte eine Melt Analyse, um die Reinheit und Identität der Amplifikate zu verifizieren.

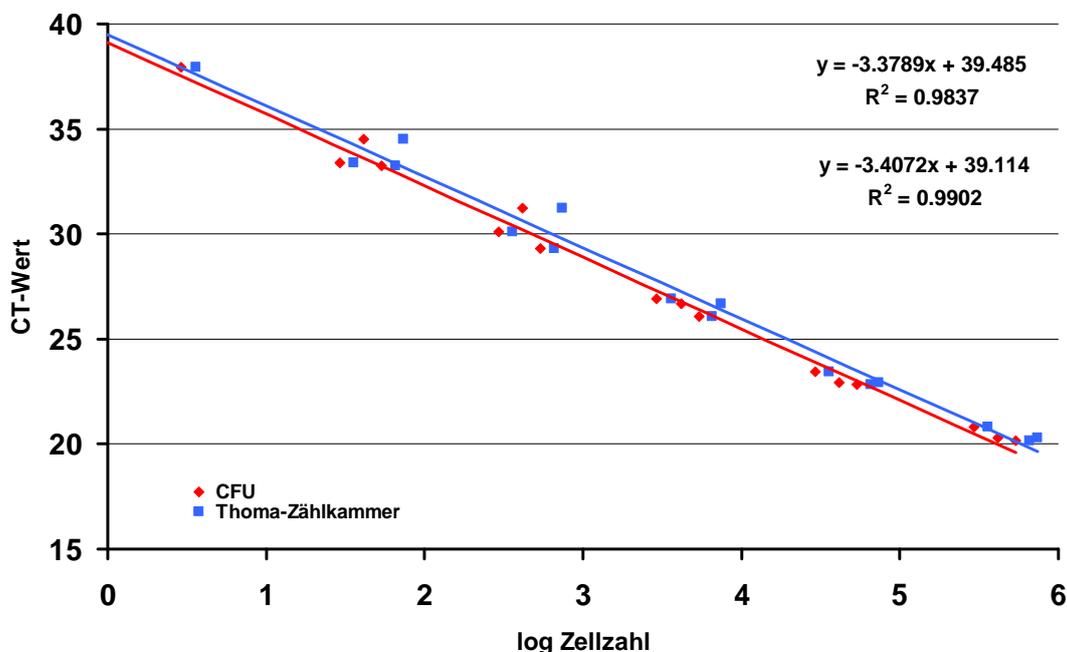


Abbildung 1: Standardgeraden zur absoluten Quantifizierung von *E. amylovora*.

Bestimmt wurden die Gleichungen für Lebend- und Gesamtzellzahl. Proben wurden auf die Gerade mit der Gesamtzellzahl bezogen.

Die Proben bestanden aus Extrakten, bzw. Waschflüssigkeiten von Pflanzenmaterial, welche intakte Bakterienzellen enthielten. Es erfolgte keine DNA Extraktion vor der Real Time PCR Analyse. Eine absolute Quantifizierung der Bakterienanzahl in einer Probe erfolgte durch Standardisierung mit seriellen Verdünnungen gewaschener, reiner *E. amylovora* Kulturen (Abb. 1).

Die Vorbehandlung der Proben hing von der Natur der Probe ab. Für die Analyse von Blütenproben wurden in der Regel 100 Blüten in 2070 ml Whirl-Pak Beuteln (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gesammelt und mit 2 ml H₂O pro Blüte für 15 min inkubiert. Ein 1 ml Aliquot wurde entnommen und für 1 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und Pellets in 1 ml H₂O aufgenommen. Proben wurden entweder direkt analysiert, oder bis zur Real Time PCR bei -20°C gelagert.



Abbildung 2: Standorte der beprobten Obstanlagen in der Bodenseeregion.

1 Höchst I, 2 Höchst II, 3 Lindau I, 4 Lindau II, 5 Wellmutsweiler, 6 Stadel, 7 Markdorf I, 8 Markdorf II, 9 Dingelsdorf, 10 Bodman I, 11 Bodman II, 12 Bodman III, 13 Bodman IV, 14 Stahringen, 15 Gaienhofen, 16 Öhningen, 17 Wellmutsweiler, II 18 Bodman V, 19 Kaltbrunn, 20 Litzelstetten, 21 Höchst III, 22 Mainau, 23 Reute, 24 Ludwigshafen

Die Analyse der epiphytische Besiedlung von anderen Pflanzenorganen (Blätter, Fruchtmumien) erfolgte auf ähnliche Art und Weise, allerdings wurden hier 10 ml

H₂O pro mg Frischgewicht eingesetzt. Für die Bestimmung der endophytischen Verteilung von *E. amylovora* im Gewebe wurde Pflanzenmaterial zunächst oberflächlich abgewaschen und dann mit einer Rasierklinge grob zerkleinert. 100 mg des zerkleinerten Materials wurde in 3 ml H₂O aufgenommen und in 12 ml Sarstedt Reaktionsröhrchen für 15 min auf einem Intelli-Mixer (LTF-Labortechnik, Wasserburg) inkubiert (Program F4 bei 25 rpm). Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben. Für die künstliche Inokulation von Apfeltrieben (Sorte Jonagold) wurde das erste Blatt mit einer Schere angeschnitten, die zuvor in eine Suspension mit 10⁹ Bakterien/ml getaucht wurde. Es erfolgte eine kontinuierliche, visuelle Bonitur. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Triebe gestückelt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Epidemiologie des Erregers

Optimale Beprobungsbedingungen zur Untersuchung der Epidemiologie von *E. amylovora* bot der Standort Karsee im Allgäu, an dem von 2004 bis 2008 im Rahmen eines im Bundesprogramm ökologischer Landbau geförderten Projektes von Dr. S. Kunz (Universität Konstanz) Versuche zur Feuerbrandbekämpfung nach künstlicher Inokulation durchgeführt wurden. Durch die künstliche Inokulation mit dem Feuerbranderreger am Standort Karsee konnte ein kontrolliertes Monitoring erfolgen. Der Standort Karsee wurde ab 2009 durch einen Neuen in Mühlingen (bei Stockach, Landkreis Konstanz) abgelöst. Des Weiteren erfolgten Probennahmen in einer Erwerbsobstanlage in Höchst in Vorarlberg (Österreich) und in Wellmutsweiler im Bodenseekreis, in denen der natürliche Erregerdruck dem in Karsee entsprach. Untersucht wurden Rindenproben, Apfelblüten und Apfelblätter, die randomisiert, ohne Rücksicht auf das Blattalter, von nicht sichtbar infizierten Trieben gepflückt wurden. Außerdem wurden Scheindöldchen der Vogelbeere (*Sorbus aucuparia*), die ebenfalls zum Wirtspflanzenspektrum von *Erwinia amylovora* gehört, beprobt. Ab Februar 2008 erfolgte die Detektion des

Erregers zusätzlich auf Fruchtmumien verschiedener Apfelsorten. Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob *E. amylovora* bei positiv getesteten Fruchtmumien epi- oder endophytisch vorkommt, wurden die zunächst in 4 ml sterilem Milliporewasser je Fruchtmumie gewaschen und das Waschwasser analysiert. Interessant erschien auch die Beprobung von Trieben von Birnen-Hochstämmen in Kaltbrunn, die 2008 Feuerbrand zeigten und an denen keine phytosanitären Maßnahmen durchgeführt worden waren. Desweiteren stand ein Birnensortengarten in Billafingen für die Untersuchungen zur Verfügung, der ebenfalls 2008 Feuerbrandbefall aufwies. In diesem Birnensortengarten wurde 2009 eine Bestandsaufnahme gemacht, um im Jahr 2010 Erkenntnisse zum Feuerbrandbefall an verschiedenen Sorten zu erlangen.

Epiphytisches Vorkommen auf Apfelblüten. Nach dem Aufsprühen der Erregersuspension am 23.04.07 wurde eine durchschnittliche Konzentration von 5×10^6 Bakterien/Blüte auf inokulierten Bäumen in Karsee ermittelt (Daten nicht gezeigt). Auf den Blüten der nicht inokulierten Bäume (Tab. 1 und Abb. 3) konnte am 23.04. und 25.04. kein Feuerbranderreger nachgewiesen werden.

Erst am 27.04. war der Nachweis in einer von zwei Proben positiv und ab dem 29.04. wurde der Erreger in allen Proben nachgewiesen. Die Erregerkonzentration an den nicht inokulierten unbehandelten Bäumen erreichte bis zum Ende der Blüte ca. 7.000 Zellen/Blüte (01.05.) und stieg auf den Blüten nach dem Fall der Blütenkronblätter bis zum 07.05. auf fast 10^5 Zellen/Blüte. Obwohl bei diesen Probennahmen nur optisch symptomlose Blüten genommen wurden, ist nicht auszuschließen, dass bereits infizierte Blüten in die Probe gelangten, die ein hohes endophytisches Erregerpotential hatten, aber noch symptomlos waren. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die Methode des Blüten-Monitorings mit Real Time PCR Quantifizierung funktioniert.

In Karsee wurden zusätzlich zu den Blüten **Apfelblätter auf ein epiphytisches Vorkommen** von *E. amylovora* untersucht (Abb. 3).

Im Jahr 2007 generierte die erste Probe der Apfelblätter bereits ein deutliches Signal mit $7,5 \times 10^2$ Zellen/Blatt (Abb. 3). Innerhalb der darauf folgenden zehn Tage stieg die Zellkonzentration im Blattwaschwasser um fast drei Zehnerpotenzen auf $3,5 \times 10^5$ Zellen/Blatt an; dieser Wert war sogar noch höher als die bei Blühende bestimmte Zellzahl auf symptomfreien, nicht inokulierten Apfelblüten ($2,4 \times 10^4$

Zellen/Blüte). Während dieses Zellzuwachses regnete es mehrfach. Gleichzeitig nahm die Zellzahl in Waschwassern von symptomfreien, verblühten Apfelblüten um zwei Zehnerpotenzen zu. Bis sechs Wochen nach Blühende ließ sich der Erreger auf dem Apfelblatt nachweisen, wobei die Signalstärke in den letzten vier Wochen stark abnahm. Ende Juli, drei Monate nach der Inokulation mit dem Erreger, konnte dieser im Blattwaschwasser in Karsee nicht mehr detektiert werden.

Tabelle 1: Wetterdaten, Feuerbrandprognoseberechnungen (nach P. Triloff, der ein EIP von 90 als 100% setzt; Das EIP wird anhand von tatsächlich gemessenen Temperaturen errechnet, nicht über Sinuskurve) zum Freilandversuch Karsee 2007.

Datum	offene Blüten	T _{mit} [°C]	EIP für Blüteninf.	Risiko	E.a.*/Blüte
23. April	10	11,7	73	M	< 50
24. April		11,4	88	M	
25. April	50	14,8	125	HT-	<50
26. April		13,6	112	HT-	
27. April**	80	12,8	100	HT-	5x10 ²
28. April		12,9	121	HT-	
29. April		12,2	119	HT-	7,7x10 ³
30. April	90	12,6	92	HT-	
01. Mai		10,9	93	M	7x10 ³
02. Mai		12,0	76	M	
03. Mai	99	11,2	42	M	
04. Mai		9,2	29	M	
05. Mai		9,4	2	M	
06. Mai		10,5	0	M	
07. Mai		11,1	0	M	1x10 ⁵
08. Mai		13,9	0	M	
09. Mai		12,5	0	M	5x10 ⁴
10. Mai		14,8	22	M	
11. Mai		15,0	33	M	
12. Mai		13,9	49	M	
13. Mai		16,5	118	M	8x10 ⁶

* Die epiphytische Besiedelung der Blüten mit *E. amylovora* wurde mit einer Real Time PCR Methode ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2-4 Proben bestehend aus jeweils 20 Blüten, die von unbehandelten, nicht inokulierten Bäumen entnommen wurden.

** Am 27.4.07 wurden die Bäume mit einem Freilandprüher besprengt. Die eingesetzte Wassermenge entspricht ca. 5 mm Regen.

Gelb unterlegt ist das Datum der künstlichen Inokulation (23.04. - 10% offener Blüte) von 40 Pinova-Bäumen mit einer *Erwinia*-Suspension aus drei Stämmen (*Ea* 639; *Ea* 705, *Ea* 763) mit einer Konzentration von 5x10⁷ Zellen/ml (insg. 4 Liter Bakteriensuspension).

In der Erwerbsobstanlage in Höchst (Österreich) wurden ebenfalls Apfelblätter beprobt. Am ersten Probenstag in Höchst (21.05.07) konnten $4,2 \times 10^4$ Zellen/Blatt mit der Real Time PCR nachgewiesen werden (Abb. 3). Dieser Wert entsprach der vor dem Ende der Blüte ermittelten Zellzahl, die auf nicht inokulierten Apfelblüten in Karsee zu finden war. Bis Mitte Juli wurden positive Signale generiert, bis auf den Blättern *E. amylovora* Anfang August nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

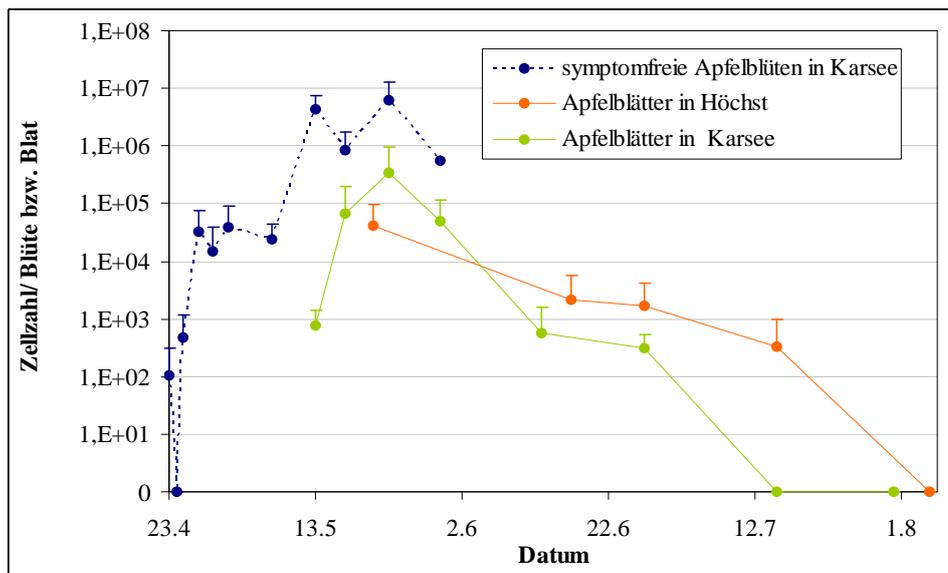


Abbildung 3: Quantifizierung von *E. amylovora* auf Apfelblättern (Versuchsjahr 2007).

Waschwasser wurden mit der Real Time PCR analysiert. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Waschwasseranalysen symptomatischer Apfelblüten aus Karsee mit aufgeführt.

Ähnliche Verläufe wurden im Jahr 2008 in der Anlage in den Anlagen Höchst I, Höchst II und Wellmutsweiler ermittelt (Abb. 4).

In den Erwerbsobstanlagen Höchst I, Höchst II und in Wellmutsweiler herrschte in 2008 ein natürlich hoher Inokulumdruck (dieser wurde durch die Beprobung der Blüten während der Hauptblüte und der Nachblüte bestimmt). Daher wurden in diesen Anlagen zusätzlich zum Blüten-Monitoring Blätter und Fruchtmumien beprobt. Bereits kurz nach Blühende (09.05.08) konnten bei den ersten Blattproben Bakterienmengen zwischen 10^2 und 10^3 Zellen/Blatt in Höchst I und Wellmutsweiler detektiert werden. Die Zellzahlen stiegen daraufhin in den Anlagen Höchst I und Wellmutsweiler bis zum 03.06.08 kontinuierlich um bis zu drei Zehnerpotenzen an. Maximale Zellzahlen wurden in der Anlage Höchst I mit $5,2 \times 10^5$ Zellen/Blatt, in der Anlage Wellmutsweiler mit $3,4 \times 10^5$ Zellen/Blatt

gemessen. Nach dem 03.06.08 sanken die nachgewiesenen Zellzahlen stetig. In der Anlage Höchst II konnten im Vergleich wesentlich geringere Zellzahlen detektiert werden, maximal $3,9 \cdot 10^3$ Zellen/Blatt am 20.05.08.

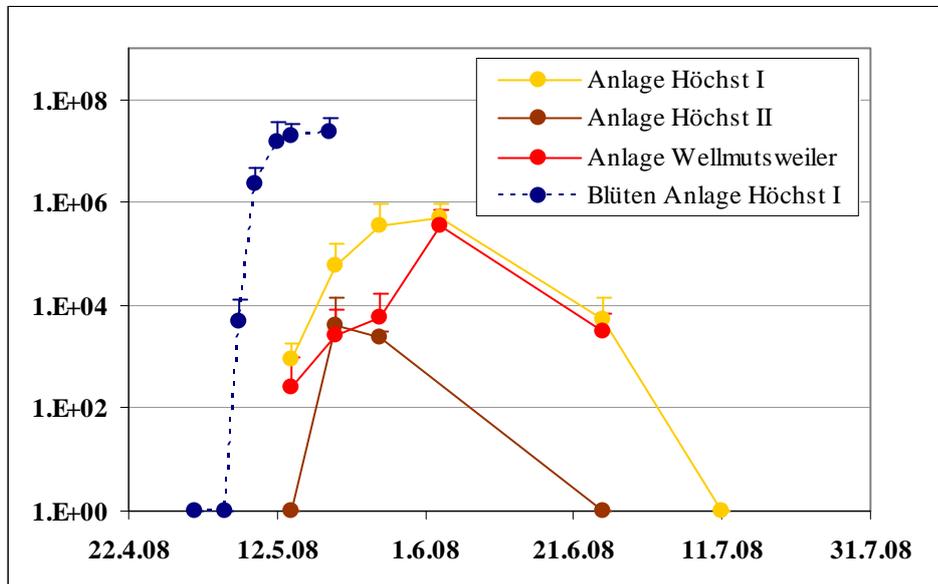


Abbildung 4: Quantifizierung von *E. amylovora* auf Apfelblättern (Versuchsjahr 2008).

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Waschwasseranalysen von Apfelblüten aus Anlage Höchst I mit aufgeführt. Blütendaten wurden über das Blühende (09.05.08) an Nachblühern erfasst.

Maximale Zellzahlen auf Blättern blieben deutlich unter den auf Blüten nachgewiesenen Zahlen zurück. So konnten in der Anlage Höchst I maximal $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/Blüte nachgewiesen werden, auf Blättern hingegen nur $5,2 \cdot 10^5$ Zellen/Blatt.

Von Februar 2008 bis Juni 2010 wurden insgesamt 533 **Fruchtmumienproben** im Bodenseeraum gesammelt und analysiert (Tab. 2). 111 von diesen Proben waren positiv hinsichtlich *E. amylovora*. Dies entspricht einem Prozentsatz von 21%, was bedeutet, dass im Durchschnitt in jeder fünften gesammelten Mumienprobe der Feuerbranderreger detektiert werden konnte. In Tabelle 2 ist erkennbar, dass die Anzahl positiver Mumienproben mit dem Auftreten von Symptomen korreliert. So wurden im ‚Feuerbrandjahr‘ 2008 viermal mehr Proben erfasst, die *E. amylovora* aufwiesen als in den kommenden zwei Jahren.

Die größten Anteile positiver Fruchtmumienproben konnten in der Anlage Höchst I gefunden werden. Über den kompletten Zeitraum der Beprobung konnten positive Feuerbrandnachweise in Fruchtmumien mit maximalen Zellzahlen von 10^9

Zellen/g Gewebe und minimalen Zellzahlen von $2,73 \cdot 10^3$ Zellen/g Gewebe erbracht werden.

Tabelle 2: Auflistung der in den Jahren 2008 bis 2010 analysierten Fruchtmumienproben (FMP) im Freiland. Gezeigt sind die jeweiligen Anlagen sowie die dort positiv getesteten Proben in Relation zur Gesamtprobenanzahl je Anlage und die Befallsstärke in der jeweiligen Anlage.

Nr	Anlage Bezeichnung	FMP `08 (positiv/gesamt)	FMP `09 (positiv/gesamt)	FMP `10 (positiv/gesamt)	gefundene Symptome			
					2007	2008	2009	2010
1	Höchst I	56/90	4/63	0/2	++++	++++	+	-
2	Höchst II	11/33	2/27	1/29	++++	++++	-	+
5	Wellmutsweiler I	7/36	4/26	0/12	n.b.	++++	-	-
	Karsee	7/22	n.b.	n.b.	++++	++++	n.b.	-
12	Bodman III	0/7	0/10	1/6	-	+	-	-
9	Dingelsdorf	1/27	1/15	0/4	+	-	-	-
17	Wellmutsweiler II	n.b.	1/32	1/18	n.b.	+	-	-
13	Bodman IV	n.b.	0/2	0/2	-	+	-	-
18	Steißlingen	n.b.	4/4	1/3	n.b.	++	-	+
20	Litzelstetten	1/16	0/14	0/3	-	-	-	-
19	Kaltbrunn	n.b.	3/6	n.b.	n.b.	++++	-	-
25	Uhdingen	n.b.	n.b.	6/39	n.b.	n.b.	++	-
Summe		82/216	19/199	10/118				

n.b. nicht bestimmt

Befall	Graphische Darstellung
kein Befall	-
einzelne Befallsstellen	+
≥ 10% der Bäume befallen	++
jeder Baum befallen	+++
mehrere Befallsstellen pro Baum	++++

In den übrigen Anlagen konnten ebenfalls zahlreiche Fruchtmumienproben positiv auf *E. amylovora* getestet werden, jedoch mit deutlich reduzierter Frequenz. Ein Nachweis lebender Zellen durch Anreicherung konnte über den gesamten Beprobungszeitraum erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Für keine der beprobten Anlagen konnte ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit positiver Nachweise und Jahreszeit, Niederschlag oder Temperatur festgestellt werden. Um einen Eindruck über die Verteilung des Erregers zu erhalten, wurden in der Anlage Höchst I sowie in der Anlage Höchst II zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 10 bzw. 20 Einzelmumien pro Reihe gesammelt, einzeln aufgearbeitet und analysiert. Es zeigte sich, dass im Schnitt ein bis drei Mumien je zehn Mumien für das positive Signal verantwortlich waren. Maximal konnten pro Einzelmumie $9,8 \cdot 10^6$ Zellen/g Gewebe nachgewiesen werden.

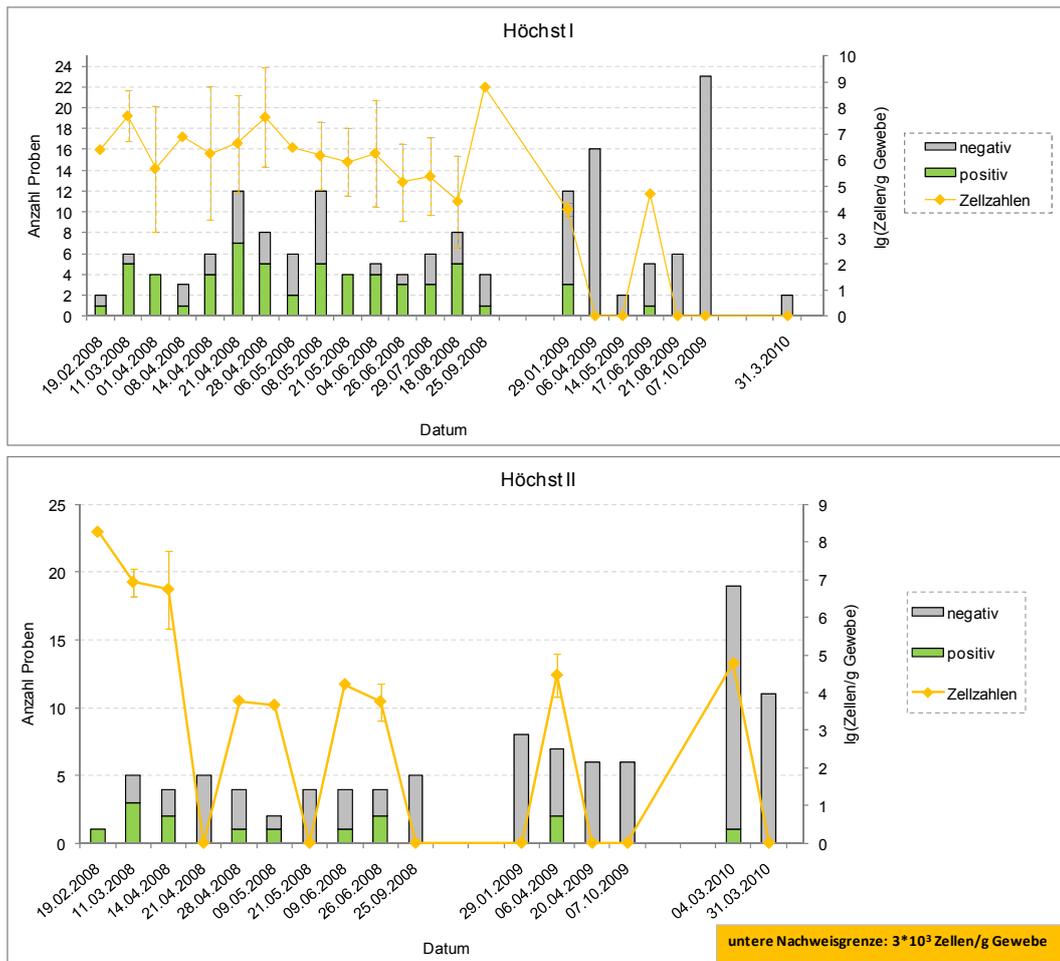


Abbildung 5: Feuerbrandnachweis in Fruchtmumien in den Jahren 2008 bis 2010.

Gezeigt werden die Anteile positiver Mumienproben (grün) sowie die Mittelwerte der logarithmierten Zellzahlen/g Gewebe positiv getesteter Proben mit Standardabweichungen über den Zeitraum der Beprobung (orange). Die untere Nachweisgrenze lag bei $3 \cdot 10^3$ Zellen/g Gewebe.

Wurden positive Einzelmumien gefunden, konnten für beide Anlagen und alle Beprobungszeitpunkte jeweils Lebendnachweise mit Hilfe der Anreicherungskultur erhalten werden. 13 Mumienproben aus den Anlagen Höchst I und II wurden daraufhin untersucht, ob das *E. amylovora* - Signal von einer **epi- oder endophytischen** Besiedelung kommt. Zum einen wurden so Mumienproben gefunden, die sowohl epiphytisch als auch endophytisch ähnliche *E. amylovora* Zellzahlen aufwiesen. Andere Proben zeigten epiphytisch nur geringe Bakterienzahlen, wobei endophytisch ein Vielfaches (Anstieg um mehr als zwei Zehnerpotenzen) nachgewiesen werden konnte. Lediglich eine Probe zeigte epiphytisch mehr Erreger als endophytisch (Daten nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass die Detektion von *E. amylovora* in Fruchtmumien vor der

Vegetationsperiode Aufschluss über den Inokulumsdruck in einer Obstanlage geben kann.

Im Jahr 2009 wurden insgesamt 78 **Triebproben**, sowohl von Apfel als auch von Birne analysiert. Bei der Untersuchung von Trieben von Apfel- und Birnenhochstämmen in Kaltbrunn (Standort 19) wurden die Feuerbrandbakterien in vier von vierzehn Proben mittels Real Time PCR nachgewiesen. Diese Hochstämme zeigten sowohl 2008 als auch teilweise 2009 Feuerbrandsymptome. Desweiteren wurden die Versuchsbäume in der künstlich inokulierten Anlage in Mühlingen im Juli untersucht. Zwölf der 37 Triebe wiesen *E. amylovora* auf. Zwei Drittel der positiv getesteten Triebe stammten dabei von Bäumen, die auch visuell Feuerbrand-befallen waren.

Von Mai bis Juli 2009 wurden außerdem **Rindenproben** von Apfelbäumen am Versuchsstandort Mühlingen untersucht. In dieser Versuchsanlage wurden Bäume mit dem Feuerbranderreger künstlich inokuliert. Die Rindenproben stammten sowohl vom Haupttrieb als auch von der Unterlage Feuerbrand-befallener Apfelbäume. Das Bakterium *E. amylovora* konnte aber dennoch nur in drei von 30 Proben, also in 10% der Fälle, nachgewiesen werden.

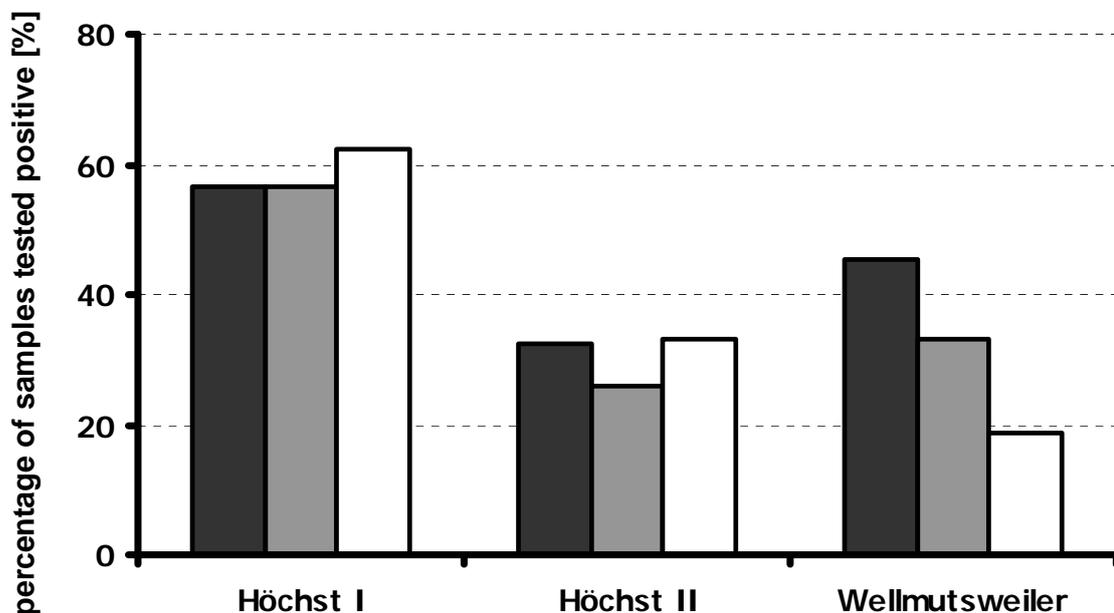


Abbildung 6: Vergleich Blütenmonitoring ■, Blattmonitoring ■ und Fruchtmumienmonitoring □ im Jahr 2008.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die epiphytische Beprobung von Blättern, wie auch das Fruchtmumien-Monitoring eine Erweiterung des Blüten-Monitorings darstellen und genutzt werden können, um auch über den Blühzeitraum hinaus den Erregerdruck einer Anlage quantitativ zu erfassen.

3.1.2 Frühzeitiger Nachweis und Monitoring

Das von Salm und Geider (2004) entwickelte Real Time PCR Setup wurde von uns so modifiziert, dass Blütenproben ohne vorhergehenden Zellaufschluss und/oder DNA Extraktion direkt bezüglich der vorhandenen Menge des Erregers hin analysiert werden konnten. Ziel war die Etablierung der Methodik zum Einsatz der Real Time PCR als „Monitoring-Instrument“ zur Bestimmung des in einer Anlage vorliegenden Erregerdruckes und eine möglichst frühzeitige Detektion des Erregers, um geeignete Pflanzenschutzmaßnahmen rechtzeitig einleiten zu können.

Tabelle 3: Ergebnisse des Real Time PCR basierten Blütenmonitorings im Jahr 2008 (exemplarisch).

	Deutschland							
Standort	Bodman				Höri		Lindau	
Nummer	12	10	13	11	15	16	4	3
Apfel	3/24	0/3	5/53	1/14	2/4	0/2	0/4	14/21
Birne		0/2						
Gesamt	3/24	0/5	5/53	1/14	2/4	0/2	0/4	14/21
Positive [%]	12,5	0	9,4	7,1	50,0	0	0	66,7
Symptome ^a	+	-	+	-	++	-	-	++++

	Deutschland						Österreich	
Standort	Dingelsdorf	Markdorf		Stadel	Stahringen	Wellmutsweiler	Höchst	
Nummer	9	7	8	6	14	5	1	2
Apfel	0/22	1/29	2/32	0/8	1/2	20/44	77/136	21/65
Birne				1/24		1/18	6/21	
Gesamt	0/22	1/29	2/32	1/32	1/2	21/62	83/157	21/65
Positive [%]	0	3,4	6,3	3,1	50,0	33,9	52,9	32,3
Symptome ^a	-	-	+	-	+	++	++++	++

Erste Zahl = positive Proben, 2. Zahl = Gesamtproben

^a - = keine Symptome; + = sporadische Symptome; ++ = Symptome an mehr als 10% der Bäume; +++ = 1 Symptom pro Baum; ++++ = mehrere Symptome pro Baum

Im ersten Versuchsjahr wurden die Proben noch direkt im Feld analysiert, was schlussendlich für eine schnelle Entscheidungsfindung auch wünschenswert wäre. Das erste Versuchsjahr sowie die Analysen, die im Rahmen des Forschungsprojektes 04HS008 durchgeführt wurden, haben klar gezeigt, dass die Methodik im Feld anwendbar ist. Aufgrund des großen Probenvolumens wurde in den darauffolgenden Jahren auf eine Feldanalyse verzichtet und die Proben im Labor analysiert.

Die in Tabelle 3 exemplarisch für das Versuchsjahr 2008 dargestellten Ergebnisse zeigen eine klare Korrelation auf zwischen der Anzahl positiver Proben in einer Anlage und der nachfolgenden Ausbildung von Symptomen im weiteren Verlauf der Wachstumsphase. Insofern ist die Methode eindeutig geeignet ein Feuerbrand-Monitoring durchzuführen. Problematisch sind die absolute Probenanzahl, um eindeutig zu bestimmen, ob eine Anlage Feuerbrand-frei ist und die untere Nachweisgrenze der Methode. Ein negativer Real Time PCR Nachweis ist in keinem Fall gleichbedeutend mit dem nicht-Vorhandensein des Erregers. Vielmehr könnte die Bakterienmenge gerade unter der Nachweisgrenze liegen und bei guter Witterung sich dennoch eine kritische Erregerpopulation aufbauen. Festzuhalten bleibt aber die prinzipielle Eignung der Methode zur Quantifizierung des Erregers und zur eindeutigeren Abschätzung des Erregerdruckes.

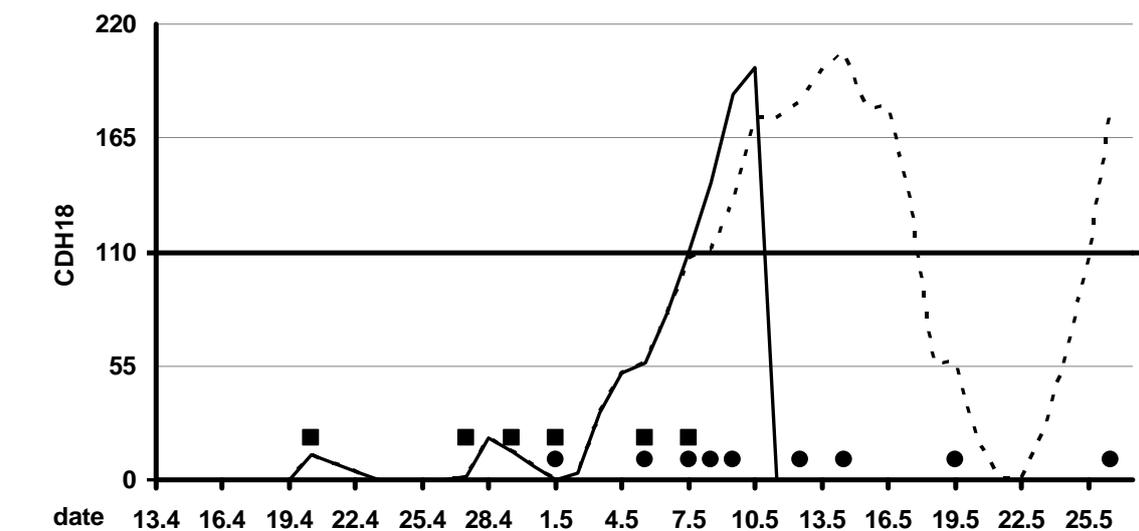


Abbildung 7: Frühzeitiger Erregernachweis.

CDH18 Werte für Birne (—) und Apfel (---) im Jahr 2008 für die Anlage Höchst 1. ■ positive Birnen-Probe, ● positive Apfel-Probe.

Ein wesentlicher Aspekt beim Monitoring ist der frühzeitige Nachweis des Erregers. Abbildung 7 zeigt deutlich, dass sowohl bei Birne, als auch bei Apfel ein positiver Nachweis auf *E. amylovora* geführt werden konnte, lange bevor die CDH18 Werte den kritischen Schwellenwert von 110 erreichten. Somit ermöglicht die Methode auch einen frühen Einblick in die Entwicklung des Erregers und erleichtert so die Entscheidungsfindung zum adequaten Einsatz von Schutzmaßnahmen. Beim positiven Nachweis früh in der Entwicklungsphase kann somit frühzeitig in die Entwicklung des Erregers eingegriffen werden und so der Aufbau gefährlicher Populationen unterbunden werden. Gleichzeitig erlaubt die quantitative Erfassung des Erregers auch eine gezielte Adaptation von Spritzstrategien. Beispielsweise könnten kleinere Populationen mit Alternativmitteln angegangen werden, während bereits in der frühen Entwicklungsphase hohe Erregerdichten den Einsatz von Streptomycin-haltigen Mitteln nahelegen würden (zumindest bis Alternativen zu Streptomycin gefunden sind).

3.1.3 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich zwischen der am LTZ-S durchgeführten Nested-PCR und der an der UKN etablierten Real Time PCR zum Nachweis des Feuerbranderreger erfolgte wie geplant im ersten Förderabschnitt des Projektes im Herbst 2007.

Die Nested-PCR nach McManus und Jones (1995) und die Real Time PCR wurden hinsichtlich der Sensitivität verglichen. Die untere Nachweisgrenze beider Nachweisverfahren liegt bei einer bis zehn Zellen je 10 µl. In vier von zehn Fällen generierte eine Verdünnungsstufe mit der Real Time PCR noch ein positives Signal, mit der Nested-PCR jedoch nicht mehr (Tab. 4). In drei anderen Fällen, war die Nested-PCR sensitiver. Dreimal lag die Detektionsgrenze bei derselben Verdünnungsstufe der Zellsuspension. Konzentrationen unter zehn Zellen je 10 µl können nicht mit 100%iger Reproduzierbarkeit detektiert werden, da die kleinen Volumen bei diesen Zellzahlen nicht immer Template enthalten müssen. Daher erweist sich das eine Mal die Real Time PCR als sensitiver, ein anderes Mal die Nested-PCR.

Tabelle 4: Aufstellung der relativen Sensitivitäten der Nested- und der Real Time PCR.

Anzahl der Vergleiche	Nested	Real Time PCR	sensitiver Gleiche Sensitivität
10	3	4	3

Die Nested-PCR ermöglicht ausschließlich eine qualitative Aussage. Die Real Time PCR hingegen kann zusätzlich zur Detektion die vorhandene Inokulummenge quantifizieren (Tab. 5).

Tabelle 5: Vergleich der Sensitivitäten der Nested- und der Real Time PCR.

Analyse einer dezimalen Verdünnungsreihe einer *E. amylovora* Zellsuspension mit beiden Methoden. Bei weniger als einer Zelle im Reaktionsansatz reichte die Fluoreszenzänderung während der Schmelzkurvenanalyse nicht für die Ermittlung der Schmelztemperatur; ein kleiner Peak bei 84°C impliziert aber eine spezifische Reaktion.

Nachweis	Zellen/ml			
	3×10^4	3×10^3	3×10^2	3×10^1
Nested-PCR				
Real Time PCR				
Ct-Wert	33,44	35,17	37,86	39,26
Schmelzpunkt [°C]	84,05	84,16	83,93	~84

Im Gesamten wurde festgestellt, dass die beiden Methoden im selben Sensitivitätsbereich liegen und die Ergebnisse somit verglichen werden können.

3.1.4 Molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Forschungsprojektes waren Untersuchungen zur Ausbreitung des Erregers im Gewebe. Generell gilt heute bei Feuerbrandbefall die Empfehlung eines Rückschnitts 30 cm ins gesunde Holz. Es ist aber bisher noch nicht quantitativ erfasst worden, wie schnell sich der Erreger im Gewebe ausbreiten kann und wie hoch die Bakterienlast in gesundem Gewebe sein kann. Die Untersuchungen gliederten sich in zwei Teilaspekte: Analyse von Niederstamm Produktionsstämmen aus beprobten Anlagen, die Unterlagenbefall aufwiesen und künstliche Inokulation von Trieben in Klimakammern mit visueller Bonitur flankiert durch Analyse der Bakteriendichte mittels Real Time PCR.

Mehrere Bäume der Sorte Fuji auf M9 Unterlage in der Anlage Bodman I (11) wiesen einen Unterlagenbefall auf. Die Edelreiser waren trotz der nekrotischen

Unterlage symptomfrei. Von fünf dieser Bäume wurde von zwei gegenüber liegenden Seiten des Stammes das bis zum Hartholz reichende Gewebe auf *E. amylovora* analysiert. In der nekrotischen Region der M9 Unterlage waren durchschnittlich $2,2 \times 10^4$ Zellen/mg Gewebe zu finden. In den vier Apfelbäumen ohne offensichtliche Befallsstellen in der Baumkrone konnte der Erreger direkt über der Veredelungsstelle nicht nachgewiesen werden (Abb. 8).

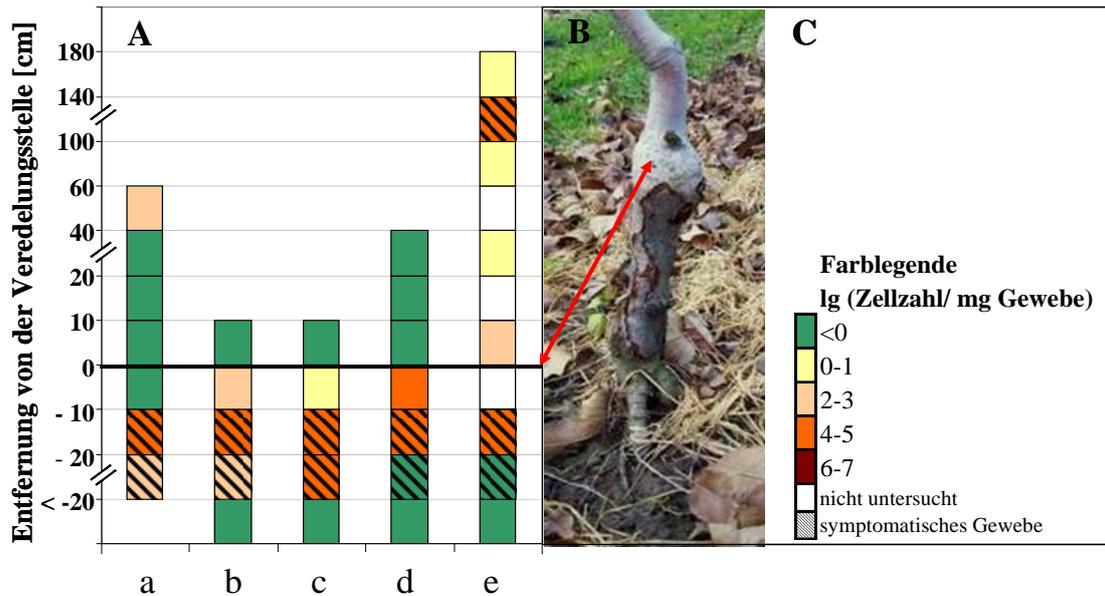


Abbildung 8: Endophytische Untersuchung von symptomatischem Unterlagenbefall (2007)

A: Schematische Darstellung von fünf untersuchten Apfelbäumen mit Unterlagenbefall (a-e: Fuji auf M9 aus Anlage 1) Proben wurden von zwei Stammseiten in definierten Abständen oberhalb und unterhalb der Veredelungsstelle entnommen. Bäume a-c und e wurden 3-4 Wochen nach der Blüte untersucht, d 8 Wochen später; B: Topaz auf M9 mit symptomatischem Unterlagenbefall, der rote Pfeil deutet auf die Veredelungsstelle, die dem Anfangspunkt der Abstandsmessung entspricht; C: Farblegende.

Aus diesen Ergebnissen könnte der Schluss gezogen werden, dass es keine Ausbreitung der Bakterien über die Veredelungsstelle gibt. Allerdings ist der Datensatz noch zu klein und Wiederholungen dieses Versuches sind notwendig, um eine gesicherte Aussage hierüber treffen zu können. Aufgrund der mit Freilandexperimenten behafteten Unsicherheit, dass weitere Infektionen auftreten können (siehe Probe e) wurde im weiteren Verlauf des Forschungsprojektes der Schwerpunkt auf einen anderen Ansatz gelegt.

Hierzu wurden in Klimakammerexperimenten junge Apfeltriebe der Sorte Jonagold künstlich mit *E. amylovora* inokuliert und der Befallsfortschritt visuell bonitiert. Gleichzeitig wurden zu bestimmten Zeitpunkten Triebe gestückelt und die

Bakterienlast in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Entfernung vom Inokulationspunkt bestimmt (Abb. 9).

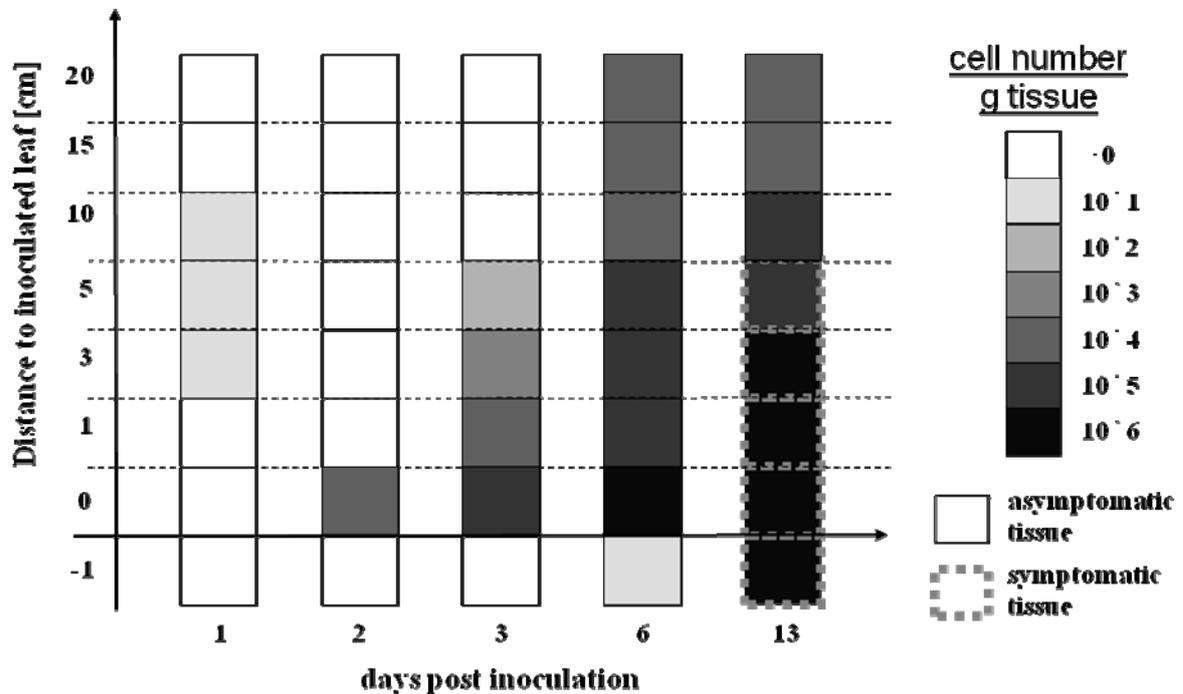


Abbildung 9: Ausbreitung von *E. amylovora* im Gewebe und sichtbare Symptome.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine rasche Ausbreitung des Erregers in nicht unerheblichen Mengen erfolgt, ohne dass Symptome sichtbar sind. Nach sechs Tagen war beispielsweise die gesamte beprobte Triebblänge mit mehr als 10^3 Bakterien/g Gewebe (teilweise bis 10^6 Zellen/g Gewebe) besetzt, ohne dass Symptome erfasst werden konnten. Erst nach 13 Tagen waren Symptome sichtbar und im beprobten Bereich hatte sich die Bakteriendichte nur unwesentlich erhöht. Auch hier sind noch weitere Experimente zur Absicherung der Datensätze nötig (gegenwärtig in Arbeit). Auch sollten diese Analysen auf unterschiedliche Sorten ausgedehnt werden.

3.1.5 Verhalten auf Nichtwirtspflanze

Die Untersuchung des Verhaltens des Erregers auf Blüten von Nicht-Wirtspflanzen war ein weiterer wichtiger Aspekt im Rahmen der Untersuchungen zur Epidemiologie von *E. amylovora*. Eine epiphytische Vermehrung des Bakteriums auf Blüten von Nicht-Wirtspflanzen bei geeigneten Wachstumsbedingungen kann

entscheidend zum frühzeitigen Aufbau eines gefährlich hohen Erregerpotentials führen, was den Befallsdruck auf den intensiv wirtschaftlich genutzten Pflanzen wie Apfel und Birne entscheidend erhöhen könnte. Auch hierzu wurden sowohl Freilandexperimente, als auch Laborexperimente durchgeführt.

Während in den Freilandexperimenten zwar ein Vorkommen aber keine Vermehrung von *E. amylovora* auf Nicht-Wirtspflanzen nachgewiesen werden konnte (Abb. 10), zeigten die Laborexperimente zumindest bei einem Teil der getesteten Nicht-Wirtspflanzen eine signifikante epiphytische Vermehrung des Erregers (Abb. 11).

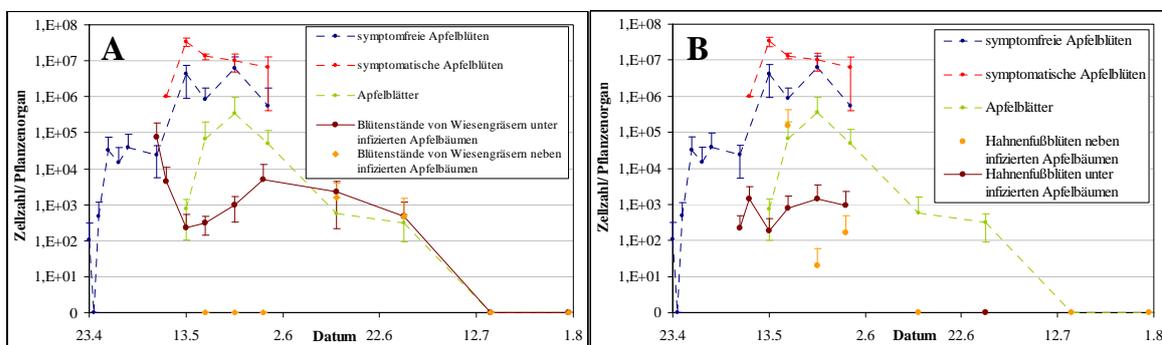


Abbildung 10: Epiphytisches Vorkommen von *E. amylovora* auf Wiesengräsem (A) und Hahnenfußblüten (B) in Karsee.

Proben wurden direkt unter und 1,5 bis 2 m neben infizierten Apfelbäumen gesammelt. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Waschwasseranalysen von Apfelblättern und Apfelblüten aus Karsee mit aufgeführt.

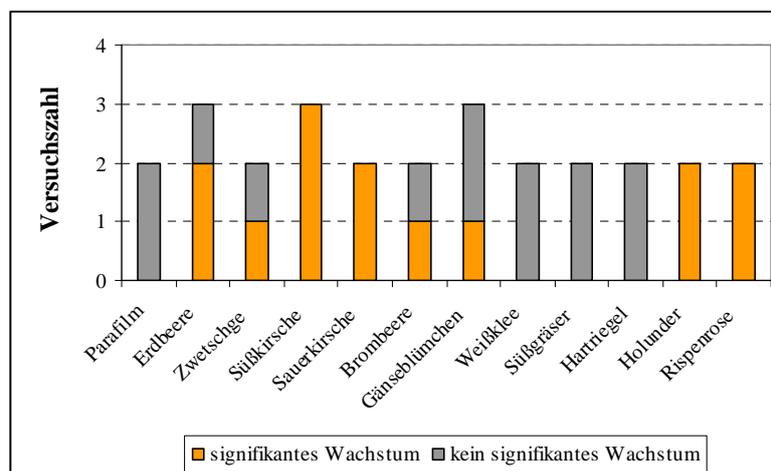


Abbildung 11: Anteil Versuche für die *E. amylovora* signifikantes Wachstum auf Nichtwirtspflanzenblüten zeigte.

Gezeigt werden Nichtwirtspflanzen für deren Blüten mehr als ein Wachstumsversuch mit *E. amylovora* durchgeführt wurde.

Gerade die epiphytische Vermehrung auf Blüten von Nicht-Wirtspflanzen stellt ein Problem dar, in der Hinsicht, dass sich auch hier bereits hohe Erregerdichten aufbauen können, welche dann von Vektoren auf Wirtspflanzen übertragen

werden. Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist, den Anbau der Nicht-Wirtspflanzen, die eine epiphytische Vermehrung von *E. amylovora* erlauben in räumlicher Nähe zu Wirtspflanzen zu vermeiden.

3.1.6 Verhalten an Vektoren

Vektoren-Analyse sollte als Alternative zum Blüten-Monitoring getestet werden. Da die Blütenbeprobung nur einen punktuellen Einblick in die Erregerpopulation in einer Anlage geben kann, sollte versucht werden durch die Analyse Blüten-besuchender Insekten eine flächendeckendere Erfassung einer Anlage zu erhalten. Im Jahr 2007 wurde damit begonnen mit der Real Time PCR mehrere Waschwasser von Bienen, die vor der Beprobung inokulierte Blüten in der Versuchsanlage in Karsee/Mühlingen besucht hatten, zu analysieren. Positive Signale konnten beobachtet werden. Im Bienenwaschwasser waren jedoch inhibitorische Substanzen, vermutlich u.a. Pollen, enthalten, die zu einer Reduzierung der PCR-Effizienz führten. Eine Quantifizierung der *E. amylovora* Menge auf Bienen war daher nicht möglich. Der Ansatz wurde in den Folgejahren nur am Rande verfolgt, da bisher keine Möglichkeit gefunden werden konnte die Inhibition der PCR durch das Bienen-Waschwasser zu eliminieren. Eine gegenwärtig an der Universität Konstanz durchgeführte Diplomarbeit beschäftigt sich nochmals intensiv mit der Möglichkeit das beobachtete Quenching der Real Time PCR Reaktion zu minimieren. Allerdings konnte bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine Technik etabliert werden, die das Quenching entscheidend reduzieren würde. Selbst eine Abtrennung der Pollen durch Filtration, oder DNA Extraktion haben bis heute nicht zu verwertbaren Ergebnissen geführt. Somit ist festzuhalten, dass das gewünschte Vektor-Monitoring mittels Real Time PCR zumindest kurz- bis mittelfristig nicht zur Quantifizierung des Feuerbranderregeres herangezogen werden kann.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der Methodenvergleich Nested-PCR - Real Time PCR (Punkt 2.5.1. im ursprünglichen Projektangebot) hat klar gezeigt, dass beide Methoden eine vergleichbare Sensitivität aufweisen, wobei die Real Time PCR gleichzeitig eine absolute Quantifizierung des Erregers erlaubt. Die Real Time PCR hat außerdem einen deutlichen Vorteil in der Geschwindigkeit, während die Nested-PCR deutlich kostengünstiger ist.

Was die Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers anbelangt (Punkt 2.4.2. im ursprünglichen Projektangebot), so wurde der Standort Karsee ab dem Versuchsjahr 2009 durch den Standort Mühlingen ersetzt. Beide Anlagen ermöglichten eine intensive Untersuchung der Epidemiologie des Erregers. So konnten hier wertvolle Erkenntnisse bezüglich der epiphytischen Überdauerung des Erregers auf Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen (siehe unten) gewonnen werden. Da in diesen Anlagen (zumindest in den Kontrollparzellen) keine Behandlungen stattfanden, ergab sich hier auch die Möglichkeit den quantitativen Erregernachweis mit anschließender Symptomausbildung unter natürlichen Bedingungen, aber nach kontrollierter künstlicher Inokulation, zu untersuchen. Insofern bieten diese Versuchsanstellungen eine hervorragende Möglichkeit die verschiedensten Fragestellungen aus dem Labor ins Freiland zu übertragen und sollten unbedingt weiter fortgeführt werden! Die Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers haben auch gezeigt, dass das Blüten-Monitoring unter Umständen ersetzt werden kann durch ein epiphytisches Blatt-Monitoring, was den Zeitraum der Überwachung einer Anlage deutlich ausdehnen würde. Eine noch bessere Alternative stellt das Mumien-Monitoring dar. Hier wäre quasi eine ganzjährige Überwachung möglich. Die Ergebnisse aus Blatt- und Mumien-Monitoring korrelierten gut mit denen des Blüten-Monitorings. Dagegen konnte bisher noch keine Möglichkeit gefunden werden das Vektor-Monitoring (Punkt 2.9. im ursprünglichen Projektangebot) zur Feuerbrandüberwachung nutzbar zu machen. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Verhalten des Erregers auf Nicht-Wirtspflanzen (Punkt 2.8. im ursprünglichen Projektangebot) legen ganz klar dar, dass bestimmte Nicht-Wirtspflanzen, auf denen eine epiphytische Vermehrung des Erregers auf Blüten möglich ist, nicht in räumlicher Nähe zu Produktionsanlagen anzubauen.

Die Ausbreitung des Erregers im Gewebe (Punkt 2.7. im ursprünglichen Projektangebot) erfolgt schnell und für längere Zeit symptomlos. Hier sind allerdings noch weitere Experimente nötig, um klare Empfehlungen bezüglich des Umfangs einer Rückschnittmaßnahme treffen zu können. Auch sollten sortenspezifische Unterschiede in der Ausbreitungsgeschwindigkeit näher untersucht werden.

Das Blüten-Monitoring in den Versuchsanlagen und in verschiedenen Erwerbsobstanlagen in Bodenseegebiet im Hinblick auf einen Frühzeitigen Erregernachweis (Punkt 2.5. im ursprünglichen Projektangebot) hat sich als sehr erfolgreich erwiesen. Nicht nur korreliert der prozentuale Anteil der positiv getesteten Proben sehr gut mit der Symptomausprägung im weiteren Verlauf der Wachstumsphase, auch ist ein positiver Nachweis lange vor dem Erreichen eines Warnaufrufs möglich. Hierdurch könnten Pflanzenschutzmaßnahmen besser terminiert und nachhaltiger zum Einsatz gebracht werden. Eine Bekämpfung des Erregers bereits lange vor dem Erreichen eines kritischen Erregerpotentials hätte größere Aussicht auf Erfolg. Eine kleine Einschränkung bei der Anwendung der Real Time PCR ergibt sich durch den Unsicherheitsfaktor, der durch die untere Nachweisgrenze, die beim Blüten-Monitoring bei 200 Zellen/Blüte liegt entsteht. Eine negative Beprobung ist also nicht gleichbedeutend mit einem Nicht-Vorhandensein des Erregers. Außerdem sollte eine bestimmte Probenzahl nicht unterschritten werden, um eine Fläche sicher zu überwachen. Der Preiseinbruch bei modernen Real Time PCR Geräten und der notwendigen Chemie lassen aber einen Einsatz der Methode in Zukunft möglich erscheinen. Unter Umständen wäre es sinnvoll, den übergeordneten Beratungseinrichtungen ein Real Time PCR Gerät an die Hand zu geben, um so die Überwachung und Beratung effizienter gestalten zu können. Es wäre auch möglich über Multiplex Reaktionen gleich mehrere möglich Krankheitserreger zu erfassen, was die Effizienz der Methode weiter steigern würde.

4. Zusammenfassung

Feuerbrand, verursacht durch das Gram-negative Bakterium *Erwinia amylovora*, stellt heute weltweit die bedeutendste bakterielle Erkrankung des Kernobstes dar. Sie ist eine nicht regelmäßig, sondern sporadisch auftretende Krankheit, deren Folgen jedoch wirtschaftlich gravierend sein können. Vor allem die landwirtschaftlich stark genutzten Wirtspflanzen Birne und Apfel sind betroffen. Ein wesentlicher Bestandteil der gegenwärtigen Bekämpfungsstrategien ist der Einsatz computergestützter Prognosemodelle für die exakte Terminierung geeigneter Pflanzenschutzmaßnahmen. Die gegenwärtig verwendeten Programme basieren allerdings nur auf der Erfassung physikalischer Parameter wie Temperatur und Feuchtigkeit. Sie beziehen das tatsächlich vorhandene Erregerpotential nicht in die Berechnungen mit ein. Der Ansatz des Forschungsprojektes war die Prüfung des Einsatzes einer Methode zur quantitativen Erfassung des Erregers, der Real Time PCR, für eine flächendeckende Erfassung des Erregerpotentials, welches dann Einfluss in die Berechnungen der Prognosemodelle finden sollte. Wir konnten zeigen, dass die Ergebnisse der quantitativen Erfassung des Erregers in Blütenproben gut mit der Symptomausbildung während der weiteren Wachstumsphase korrelieren, was die Einsatzfähigkeit der Methode bestätigt. Die Methode erlaubt außerdem eine frühzeitige Erfassung des Erregers lange bevor sich durch den Aufbau einer kritischen Erregermenge Symptome ausbilden. Eine Unsicherheit im unteren Nachweisbereich der Methode, sowie die hohe Probenzahl zur statistischen Absicherung der Ergebnisse schränken im Moment allerdings noch den flächendeckenden Einsatz der Methode ein. Die Methode konnte durch leichte Modifikation auch auf andere Pflanzengewebe ausgeweitet werden. Dies erlaubt eine Erfassung des Erregers über die Blühperiode hinaus und ermöglicht so ein ganzjähriges Monitoring des Erregers zum Beispiel an Fruchtmumien. Gleichzeitig erlaubt diese Methode auch eine Analyse der Verbreitung des Erregers auf Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen und kann somit erheblich zum Ausbau unseres Verständnisses über die epiphytische Ausbreitung des Erregers beitragen. Auch die endoptische Ausbreitung des Erregers im Gewebe kann mit dieser Methode

erfasst werden. So können wertvolle Empfehlungen für effiziente Kulturmaßnahmen untersucht und validiert werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Epidemiologie des Erregers. Aufgrund des geringen Erkenntnisstandes bezüglich der Epidemiologie des Feuerbranderregeres sollten weitere Untersuchungen auf verschiedenen Organen von Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen sowohl im Feld als auch im Gewächshaus erfolgen.

Was die Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers anbelangt (Punkt 2.4.2. im ursprünglichen Projektangebot), so konnten hier wertvolle Erkenntnisse bezüglich der epiphytischen Überdauerung des Erregers auf Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen gewonnen werden. Da in den Versuchsanlagen Karsee und Mühlingen (zumindest in den Kontrollparzellen) keine Behandlungen erfolgten, ergab sich hier die Möglichkeit den quantitativen Erregernachweis mit anschließender Symptombildung unter natürlichen Bedingungen, aber nach kontrollierter künstlicher Inokulation, zu untersuchen. Insofern bieten diese Versuchsanstellungen eine hervorragende Möglichkeit die verschiedensten Fragestellungen aus dem Labor ins Freiland zu übertragen und sollten unbedingt weiter fortgeführt werden. Die Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers haben auch gezeigt, dass das Blüten-Monitoring unter Umständen ersetzt werden kann durch ein epiphytisches Blatt-Monitoring, was den Zeitraum der Überwachung einer Anlage deutlich ausdehnen würde. Eine noch bessere Alternative stellt das Mumien-Monitoring dar. Hier wäre quasi eine ganzjährige Überwachung möglich. Die Ergebnisse aus Blatt- und Mumien-Monitoring korrelierten gut mit denen des Blüten-Monitorings.

Frühzeitiger Nachweis. Um Obstanlagen vor Befall durch Feuerbrand zu schützen kommen verschiedene Prognosemodelle zum Einsatz, die anhand von Wetterdaten die Infizierbarkeit von Blüten errechnen. Diese Modelle beziehen den Erregerdruck einer Anlage jedoch nicht in ihre Berechnungen mit ein. Durch das

Blüten-Monitoring sollte *E. amylovora* frühzeitig und schnell in Anlagen nachgewiesen und so die Prognosemodelle verbessert werden.

Das Blüten-Monitoring in den Versuchsanlagen und in verschiedenen Erwerbsobstanlagen in Bodenseegebiet im Hinblick auf einen Frühzeitigen Erregernachweis (Punkt 2.5. im ursprünglichen Projektangebot) hat sich als sehr erfolgreich erwiesen. Nicht nur korreliert der prozentuale Anteil der positiv getesteten Proben sehr gut mit der Symptomausprägung im weiteren Verlauf der Wachstumsphase, auch ist ein positiver Nachweis lange vor dem Erreichen einer Warnaufrufs möglich. Hierdurch könnten Pflanzenschutzmaßnahmen besser terminiert und nachhaltiger zum Einsatz gebracht werden. Eine Bekämpfung des Erregers bereits lange vor dem Erreichen eines kritischen Erregerpotentials hätte größere Aussicht auf Erfolg. Eine kleine Einschränkung bei der Anwendung der Real Time PCR ergibt sich durch den Unsicherheitsfaktor, der durch die untere Nachweisgrenze, die beim Blüten-Monitoring bei 200 Zellen/Blüte liegt entsteht. Eine negative Beprobung ist also nicht gleichbedeutend mit einem Nicht-Vorhandensein des Erregers. Außerdem sollte eine bestimmte Probenzahl nicht unterschritten werden, um eine Fläche sicher zu überwachen. Der Preiseinbruch bei modernen Real Time PCR Geräten und der notwendigen Chemie lassen aber einen Einsatz der Methode in Zukunft möglich erscheinen. Unter Umständen wäre es sinnvoll, den übergeordneten Beratungseinrichtungen ein Real Time PCR Gerät an die Hand zu geben, um so die Überwachung und Beratung effizienter gestalten zu können. Es wäre auch möglich über Multiplex Reaktionen gleich mehrere möglich Krankheitserreger zu erfassen, was die Effizienz der Methode weiter steigern würde.

Methodenvergleich. Der Nachweis des Feuerbranderregerers in Umweltproben erfolgte am LTZ-S mittels einer Nested-PCR; an der Universität Konstanz hingegen mit der Real Time PCR. Da ein Vergleich der Ergebnisse notwendig war, war auch ein Vergleich der Methoden hinsichtlich der Sensitivität unumgänglich.

Der Methodenvergleich (Punkt 2.5.1. im ursprünglichen Projektangebot) hat klar gezeigt, dass beide Methoden eine vergleichbare Sensitivität aufweisen. Die Real Time PCR erlaubt darüber hinaus eine absolute Quantifizierung des Erregers und

liefert deutlich schneller Resultate. Die Nested-PCR dagegen ist deutlich kostengünstiger.

Molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese. Um die Bekämpfung des Feuerbrandes mit höchst möglicher Effizienz zu verfolgen, war es essentiell, den Ursprung und den Verlauf, also die Pathogenese, dieser Pflanzenkrankheit so gut wie möglich zu kennen. Endophytische Untersuchungen befallener Pflanzen sollten über die Migration des Erregers im Gewebe Aufschluss geben.

Die Ausbreitung des Erregers im Gewebe (Punkt 2.7. im ursprünglichen Projektangebot) wurde sowohl im Freiland, als auch in Laborexperimenten untersucht. Die vorläufigen wichtigsten Erkenntnisse sind, dass die Ausbreitung des Erregers sehr schnell erfolgt und Bakterien in hoher Zahl im Gewebe vorliegen können, ohne dass Symptome zu beobachten sind. Vor dem Hintergrund der Ausbreitungsgeschwindigkeit und der hohen Zellzahlen in symptomlosem Gewebe müssen Empfehlungen zu Kulturmaßnahmen nochmals überdacht werden. Hier sind allerdings noch weitere Experimente nötig um klare Empfehlungen bezüglich des Umfangs einer Rückschnittmaßnahme treffen zu können. Auch sollten sortenspezifische Unterschiede in der Ausbreitungsgeschwindigkeit näher untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt, der weiterer Versuchsanstellungen bedarf, ist der Befund, dass bei den Analysen von Freilandproben keine Ausbreitung über die Veredelungsstelle hinweg zu erfolgen schien.

Verhalten auf Nichtwirtspflanzen. Die Vermutung lag nahe, dass in einer Erwerbsanlage, in der Feuerbrand beobachtet wird, der Erreger auch außerhalb der Wirtspflanze zu finden ist. Die Rolle von Nichtwirtspflanzen in der Epidemiologie des Erregers und die Kenntnis über weitere Wirtspflanzen waren daher für eine nachhaltige Feuerbrandbekämpfung notwendig.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Verhalten des Erregers auf Nicht-Wirtspflanzen (Punkt 2.8. im ursprünglichen Projektangebot) legen ganz klar dar, dass bestimmte Nicht-Wirtspflanzen, auf denen eine epiphytische Vermehrung des Erregers auf Blüten möglich ist, nicht in räumlicher Nähe zu Produktionsanlagen angebaut werden sollten.

Verhalten an Vektoren. Da die Ausbreitung durch Vektoren schnell und flächendeckend erfolgen kann, war es auch von Interesse mögliche Vektoren auf die Anwesenheit von *E. amylovora* hin zu testen, um so möglicherweise eine großflächigere Aussage über die Verteilung des Erregers zu erhalten, als sie durch die Blütenbeprobung möglich ist.

Das Vektor-Monitoring (Punkt 2.9. im ursprünglichen Projektangebot) als flächendeckende Alternative zum Blüten-Monitoring hat sich bis zum Projektende als nicht praktikabel erwiesen. PCR inhibitorische Substanzen machen bislang eine Quantifizierung des Erregers an Vektoren unmöglich. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf, da nach wie vor zu erwarten ist, dass ein Vektor-Monitoring eine großflächigere Abdeckung der zu untersuchenden Anlage erlauben wird.

6. Literaturverzeichnis

- Baskerville, G.L. und Emin, P. 1969. Rapid estimation of heat accumulation from maximum and minimum temperatures. *Ecology* 50: 514 – 517.
- Billing, E. 1996: BIS 95, an improved approach to fire blight risk assessment. *Acta Horticulturae* 411: 121 – 126.
- Billing, E. 1999. Fire blight risk assessment: Billing's Integrated System (BIS) and its evaluation. *Acta Horticulturae* 489: 399 - 405.
- BMVEL 2006. Bericht über die Feuerbrandsituation im Jahr 2005 und die Strategie zur Bekämpfung des Feuerbranderregers in 2005.
<http://www.bmelv.de/cae/servlet/contentblob/376948/publicationFile/22342/BerichtFeuerbrandsituation2005.pdf>
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., Burgett, D.M., Sugar, D., Loper, J. E. 1993a. Dispersal of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas fluorescens* by honey bees from hives to apple and pear blossoms. *Phytopathology* 83: 478 - 484.
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., McLaughlin, R.J., Sugar, D., Loper, J.E., Roberts, R.G. 1993b. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology* 83: 995 - 1002.
- Johnson, K.B., Stockwell, V.O., Sawyer, T.L. 2004. Adaption of fire blight forecasting to optimize the use of biological control. *Plant Dis.* 88: 41 - 48.

- Maas Geesteranus, H.P. und de Vries, P.M. 1984. Survival of *Erwinia amylovora* bacteria on plant surfaces and their role in epidemiology. *Acta Horticulturae* 151: 55 - 61.
- Marschall, K., Moltmann, E. 2002. Wie stark ist Südtirol durch Blüteninfektionen gefährdet? Auswertung von Witterungsdaten mit dem Prognosemodell Maryblyt™. *Obstbau Weinbau, Fachmagazin des Südtiroler Beratungsringes* 39: 341 – 342.
- McManus, P.S. und Jones, A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology* 85: 618-623.
- Moltmann, E. 1996a. Erfahrungen mit der Feuerbrandprognose nach verschiedenen Prognosemodellen 1994 - 1996 in Baden-Württemberg. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 48: 245 – 252.
- Moltmann, E. 1996b. Experience with different prediction systems for control of fire blight in southwest Germany. *Acta Horticulturae* 411: 131 – 137.
- Moltmann, E. 1999. Fire blight control with streptomycin according to prediction systems in South-West Germany. *Acta Horticulturae* 489: 393 - 397.
- Moltmann, E. 2004. 10 Jahre Erfahrungen mit der Feuerbrandprognose in Baden-Württemberg (1994 – 2003). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 56: 13 – 16.
- Moltmann, E.: 2006 Ten Year Summary of Fire Blight Prediction in South-West Germany (1994 - 2003). *Acta Horticulturae* 704: 177 - 181.
- Ockey, S.C. und Thomson, S.V. 2006. Influence of rain on the transient population of *Erwinia amylovora* on leaf surfaces. *Acta Horticulturae* 704: 113-120.
- Paulin, J.P. 1981. Overwintering of *Erwinia amylovora*: Sources of inoculum in spring. *Acta Horticulturae* 117: 49 - 54.
- Pusey, P. L. 1997. Crab apple blossoms as a model for research on biological control of fire blight. *Phytopathology* 87: 1096 - 1102.
- Pusey, P. L. 2000. The role of water in epiphytic colonization and infection of pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 90: 1352 - 1357.
- Sabatini, A.G., Alexandrova, M., Carpana, E., Ghini, S., Girotti, S., Porrini, C., Bazzi, C., Baroni F., Alessandrini A. 2006. Relationships between *Apis mellifera* and *Erwinia amylovora* bioindication, bacterium dispersal and quarantine procedures. *Acta Horticulturae* 704: 155 - 162.
- Salm, H. und Geider, K. 2004 Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol*, 53: 602 - 610.

- Smith, T.J. 1999. Report on the development and use of Cougarblight 98 C - a situation-specific fire blight risk assessment model for apple and pear. *Acta Horticulturae* 489: 429 - 436.
- Steiner, P.W. 1990a. Predicting apple blossom infections by *Erwinia amylovora* using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae* 273: 139 – 148.
- Steiner, P.W. 1990b. Predicting canker, shoot and trauma blight phases of apple fire blight epidemics using the Maryblyt model. *Acta Horticulturae* 273: 149 – 158.
- Steiner, P.W. und Lightner, G.W. 1996. Maryblyt™ 4.3 A predictive program for forecasting fire blight disease in apples and pears. University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA.
- Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J. und Reil, W.O. 1975. Occurrence of fire blight of pears in relation to weather and epiphytic populations of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 65: 353 - 358.
- van der Zwet, T. und Keil, H.L. 1979. Fire blight - a bacterial disease of rosaceous plants. In *Agriculture Handbook 510*, U.S. Dept. of Agriculture. Washington D.C.
- van der Zwet, T. und van Buskirk, P.D. 1984. Detection of endophytic and epiphytic *Erwinia amylovora* in various pear and apple tissue. *Acta Horticulturae* 151: 69 - 75.

Unterschrift:

Prof. Dr. Ralf T. Vögele