

Abschlussbericht

Projekt 06HSO36

„Bekämpfung des Feuerbrandenerregers im Obstbau
ohne Antibiotika“

Biozentrum Klein Flottbek & Botanischer Garten
Arbeitsgruppe Phytomedizin und Pflanzenschutzamt Hamburg
Yvonne Hinz, M. Rybak und G. Adam,

Untersuchungen zum Einfluss von Aloe-Latex auf die Symptomentwicklung von Feuerbrand nach Blüteninokulation von *Cotoneaster dammeri* mit *Erwinia amylovora*.

1. Einleitung

Das Ziel des Projektes „Bekämpfung des Feuerbranderregers im Obstbau ohne Antibiotika“ ist die Erarbeitung von Methoden zur biologischen Bekämpfung des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora* unter Anwendung von *Aloe vera*-Extrakten. Eine antibakterielle und antimykotische Wirkung verschiedener *Aloe vera*-Inhaltsstoffe ist bereits bei diversen Erregern wissenschaftlich belegt (Soeda et al., 1966 und Fujita et al., 1978). In den Versuchen dieses Projektes wird ausschließlich der sogenannte Aloe-Latex verwendet. Der Aloe-Latex befindet sich in Exkretzellen, die unterhalb der Epidermis des Aloe-Blattes lokalisiert sind. Er enthält die Anthrachinonglycoside Aloin A und B sowie weitere Anthraquinone, wie z.B. Aloe-Emodin, Aloeresin A, B und C, Barbaloin und Homonataloin. Weitere Bestandteile des Aloe-Latex sind sogenannte Chromonderivate (Prodöhl, 1990). In vorangegangenen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass *Aloe vera*-Pflanzenextrakte, speziell der Aloe-Latex, in vitro eine antibakterielle Wirkung bei *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* und *Acidovorax valerianellae* aufweisen (Hinz et al., 2006).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Cotoneaster* – Pflanzen

Die Versuche wurden mit der gegen den Feuerbrand hochanfälligen Wirtspflanze Zwergmispel (*Cotoneaster dammeri*) durchgeführt.

2.1.2 *Aloe vera* – Pflanzen

Die in diesem Projekt verwendeten *Aloe vera* Pflanzen stammen aus dem Gewächshaus des Botanischen Gartens, Klein Flottbek. Weiterhin wurde *Aloe vera*-Pflanzenmaterial von der Firma SANTA VERDE (Klärchenstr. 11, 22299 Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 *Erwinia amylovora* – Stämme

Die Versuche wurden mit *Erwinia amylovora* – Stämmen verschiedener Herkunft durchgeführt. An ausgewählten *Cotoneaster*-Pflanzen wurde die Pathogenität der verwendeten Stämme vorab überprüft.

2.2 Methoden

2.2.1 Aloe-Latex

Für die durchgeführten Versuche wurde lediglich der so genannte *Aloe*-Latex verwendet. *Aloe*-Latex befindet sich in den Exkretzellen, die in der Epidermis des *Aloe*-Blattes lokalisiert sind. Nach einer Verletzung oder Abschneiden des Blattes tritt dieses Latex aus und kann problemlos gesammelt und verwertet werden. Zum Erstellen einer Verdünnung wurde steriles Aqua demin. verwendet. Frisches, pures *Aloe*-Latex kann zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank gelagert werden.

2.2.2 *In vitro*-Versuche

Im Vorfeld dieses Projektes wurde die antibakterielle Wirkung von *Aloe*-Latex bereits an verschiedenen Erregern nachgewiesen.

Die antibakterielle Wirkung wurde auch mittels Plattentest an *Erwinia amylovora* überprüft. Dazu wurden Platten mit selektivem Medium und *Erwinia amylovora* in den Konzentrationen 10^6 und 10^8 Zellen/ml erstellt. In jede Platte wurden anschließend zwei Vertiefungen gestanzt und in diese 150 μ l *Aloe*-Latex pur und in den Verdünnungen 1/10 und 1/100 pipettiert. Als Kontrolle diente 0,01% Streptomycin sowie steriles Aqua demin. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 27°C für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Hemmhöfe wurden protokolliert.

2.2.3 *In vivo*-Versuche

Die ersten Versuche wurde in einer Klimakammer der Universität Hamburg unter konstanten Bedingungen (Temperatur: 24°C von 10:00-17:00 Uhr; 18°C von 17:00-10:00 Uhr; Licht: 6:00- 20:00 Uhr) durchgeführt.

Unter diesen Bedingungen wurden die *Cotoneaster*-Pflanzen gleichzeitig zum Blühen gebracht. Nach folgendem Schema sollte die Wirksamkeit des *Aloe*-Latex überprüft werden:

1. Pflanze: Kontrolle *Aloe*-Latex pur
2. Pflanze: Kontrolle *Erwinia amylovora*
3. Pflanze: Kontrolle Aqua demin.
4. Pflanze: *Aloe*-Latex pur und *Erwinia amylovora* gleichzeitig
5. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde vor *Aloe*-Latex pur
6. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde nach *Aloe*-Latex pur
7. Pflanze: *Erwinia amylovora* 3 Stunden nach *Aloe*-Latex pur
8. Pflanze: *Erwinia amylovora* 12 Stunden nach *Aloe*-Latex pur
9. Pflanze: *Aloe*-Latex 1/10 und *Erwinia amylovora* gleichzeitig
10. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde vor *Aloe*-Latex 1/10
11. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde nach *Aloe*-Latex 1/10
12. Pflanze: *Erwinia amylovora* 3 Stunden nach *Aloe*-Latex 1/10
13. Pflanze: *Erwinia amylovora* 12 Stunden nach *Aloe*-Latex 1/10
14. Pflanze: *Aloe*-Latex 1/100 und *Erwinia amylovora* gleichzeitig
15. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde vor *Aloe*-Latex 1/100
16. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde nach *Aloe*-Latex 1/100
17. Pflanze: *Erwinia amylovora* 3 Stunden nach *Aloe*-Latex 1/100
18. Pflanze: *Erwinia amylovora* 12 Stunden nach *Aloe*-Latex 1/100

Bei allen *Cotoneaster*-Pflanzen wurde eine Blüteninokulation mit einer *Erwinia amylovora*-Suspension (Konzentration 10^8 Zellen/ml, 10 μ l/Blüte) durchgeführt. Der *Aloe*-Latex wurde ebenfalls laut Schema mittels Spritze auf die Blüten aufgebracht (10 μ l/Blüte).

Die Bonitur der Pflanzen erfolgte täglich nach der Inokulation.

Weitere in vivo-Versuche wurden im Gewächshaus der Universität Hamburg durchgeführt. Die Cotoneaster-Pflanzen wurden hier unter folgenden Bedingungen zum Blühen gebracht: Temperatur nachts: 18 °C, tags: 23 °C, Licht: 8:00-18:00 Uhr. Die Inokulation der Pflanzen erfolgte nach folgendem Schema:

1. Pflanze: Kontrolle *Aloe-Latex* pur
2. Pflanze: Kontrolle *Erwinia amylovora*
3. Pflanze: *Aloe-Latex* pur und *Erwinia amylovora* gleichzeitig
4. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde vor *Aloe-Latex* pur
5. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde nach *Aloe-Latex* pur
6. Pflanze: *Erwinia amylovora* 3 Stunden nach *Aloe-Latex* pur
7. Pflanze: *Erwinia amylovora* 12 Stunden nach *Aloe-Latex* pur

Auch bei den Versuchen im Gewächshaus wurde die Blüteninokulation mit einer *Erwinia amylovora*-Suspension (Konzentration 10^8 Zellen/ml) durchgeführt. Der *Aloe-Latex* wurde ebenfalls laut Schema mittels Spritze auf die Blüten aufgebracht.

Die Bonitur der Pflanzen erfolgte täglich nach der Inokulation.

Die Versuche im Gewächshaus wurden zweimal mit *Erwinia amylovora* Stämmen unterschiedlicher Herkunft wiederholt.

2.2.4 Überprüfung mittels PCR

Die Überprüfung der eventuell erfolgten Infektion wurde mittels PCR unter Anwendung von Primer A 5`CGG TTT TTA ACG CTG GG 3` und Primer B 5`GGG CAA ATA CTC GGA TT 3` (Bereswill et al., 1992 und Llop et al., 2000) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 In vitro

Im Plattentest konnte eine deutliche Hemmhofbildung in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Verdünnungsstufen beobachtet werden und somit eine antibakterielle Wirkung bezüglich *Erwinia amylovora* in vitro nachgewiesen werden.

3.2 In vivo

Die Cotoneaster-Pflanzen (Kontrolle: *Erwinia amylovora*) reagierten unter optimalen Bedingungen sowohl in der Klimakammer als auch im Gewächshaus nach 7 Tagen mit stark ausgeprägten Feuerbrand-Symptomen.

Die Kontroll-Pflanzen, die ausschließlich mit *Aloe-Latex* behandelt wurden, zeigten keinerlei Symptome, in einigen Fällen trat jedoch eine bräunliche Verfärbung der Blüten auf.

Ergebnisse Klimakammer

Bei allen mit *Aloe-Latex* in den Verdünnungen 1/10 und 1/100 behandelten Pflanzen konnten Feuerbrandsymptome nach 10 Tagen festgestellt werden.

Die Pflanzen, die mit dem puren *Aloe*-Latex behandelt wurden, wiesen nach 12 Tagen deutliche Feuerbrandsymptome auf. Die zeitliche Komponente der Blüteninokulation spielte bei diesem Versuch keine Rolle.

Ergebnisse Gewächshaus

Bei diesem Versuch konnten bei den *Cotoneaster*-Pflanzen, die wie folgt behandelt wurden

3. Pflanze: *Aloe*-Latex pur und *Erwinia amylovora* gleichzeitig
4. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde vor *Aloe*-Latex pur
5. Pflanze: *Erwinia amylovora* 1 Stunde nach *Aloe*-Latex pur
6. Pflanze: *Erwinia amylovora* 3 Stunden nach *Aloe*-Latex pur

deutliche Feuerbrand-Symptome nach 13 Tagen beobachtet werden.

Die *Cotoneaster*-Pflanze, die erst 12 Stunden nach dem puren *Aloe*-Latex mit *Erwinia amylovora* infiziert wurde, zeigte jedoch erst nach 15 Tagen Feuerbrand-Symptome.

Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei zweimaliger Wiederholung des Versuches mit unterschiedlichen *Erwinia amylovora*-Stämmen.

3.3 PCR

Die Überprüfung der *Cotoneaster*-Pflanzen mittels PCR, die visuell Feuerbrandsymptome aufwiesen, war in allen Fällen positiv.

4. Zusammenfassung

In diesen Versuchen wurde *Aloe*-Latex auf seine Wirksamkeit gegen den Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) mittels Blütenbehandlungen an der hochanfälligen Wirtspflanze Zwergmispel (*Cotoneaster dammeri*) getestet.

Nach dem *in vitro* nachgewiesenen positiven hemmenden Effekt von *Aloe*-Latex gegen den Feuerbranderreger und andere pathogene Erreger (Hinz, 2006) zeigten die *in vivo*-Versuche eine hemmende Wirkung auf das Bakterium nach künstlicher Blüteninfektion an der Wirtspflanze *Cotoneaster dammeri*. Dabei scheint es, als ob ein langes Einwirken des *Aloe*-Latex von Vorteil für die beobachtete hemmende Wirkung gegenüber dem Pathogen ist.

Es wird deutlich, dass sich die guten *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der Hemmwirkung von *Aloe*-Latex auch in verschiedenen Verdünnungen nicht ohne Einschränkungen in den *in vivo*-Versuchen reproduzieren lassen.

5. Literatur

Fujita, K., Yamada, Y., Azuma, K., Hlirozawa, S. (1978). Effect of Leaf Extracts of *Aloe arborescens* Mill ssp. *natalensis* Berger on Growth of *Trichophyton mentagrophytes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 14, No. 1, 132-136

Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., & Geider K., (1992). Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3522-3526.

Hinz, Yvonne (2006). Entwicklung eines Screeningverfahrens zum Nachweis antibakterieller Substanzen in Pflanzenextrakten. Diplomarbeit, Universität Hamburg

Hinz, Y., Sadowska-Rybak, M., Maier, F., Adam, G., Schäfer, W. (2006). Vorversuche zur Wirkung von *Aloe vera*-Extrakten auf phythopathogene Bakterien und Pilze. Poster, 55. Deutsche Pflanzenschutztagung, Göttingen

Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., Lopez MM. (2000) Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2071-2078.

Prodöhel, S. (1990). Ein Beitrag zur chemotaxischen Charakterisierung von *Aloe*-Arten. Diplomarbeit, Universität Frankfurt a. M.

Soeda, M., Otomo, M., Ome, M., Kawashima, K. (1966). Studies on antibacterial and anti-fungal activities of *Cape Aloe*. Nippon Saikingaku Zasshi, 21,609-614