



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

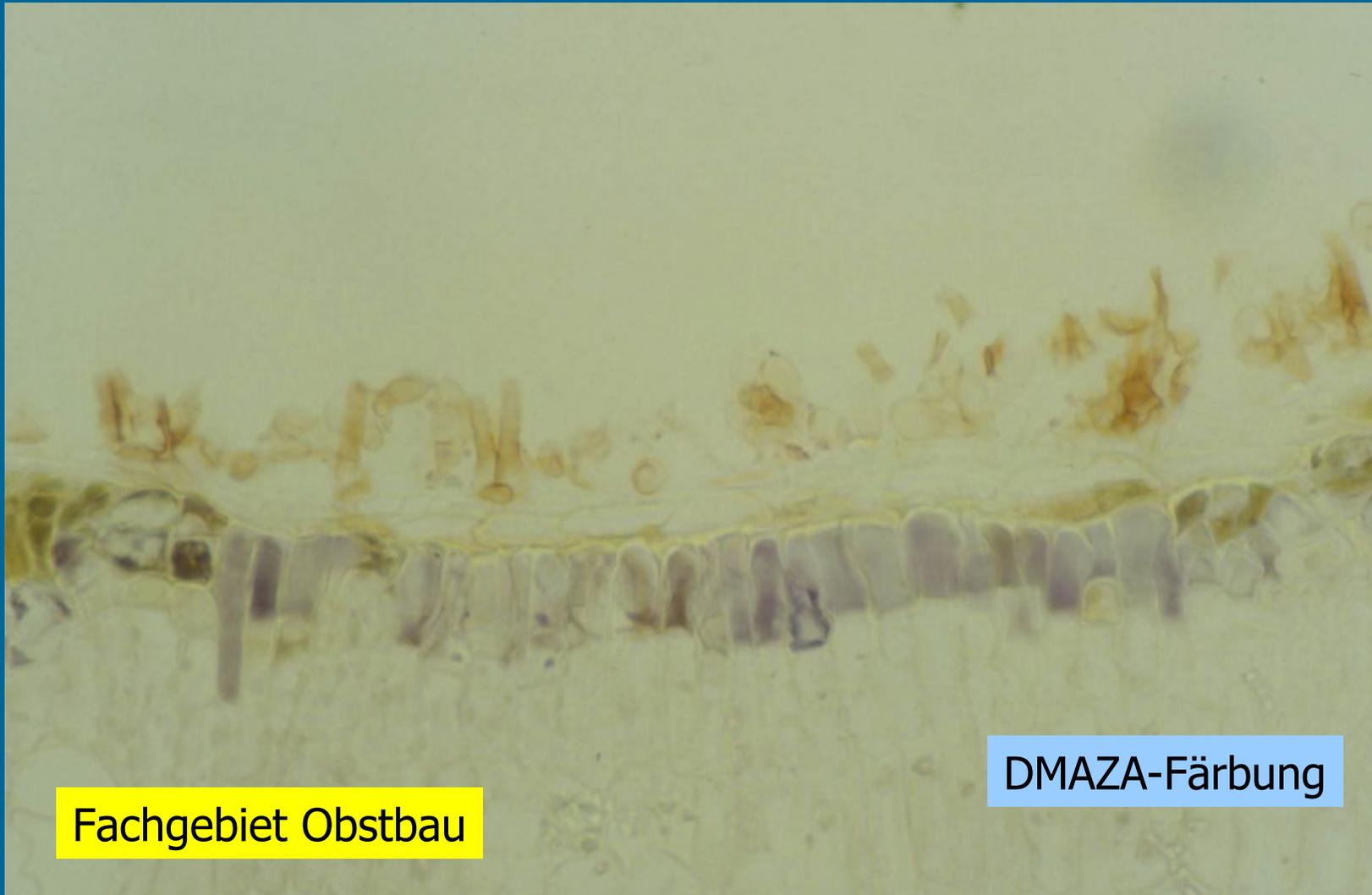
Winterfachtagung für Obstbau, Boden- und Pflanzenschutz



SCHORF

Venturia inaequalis

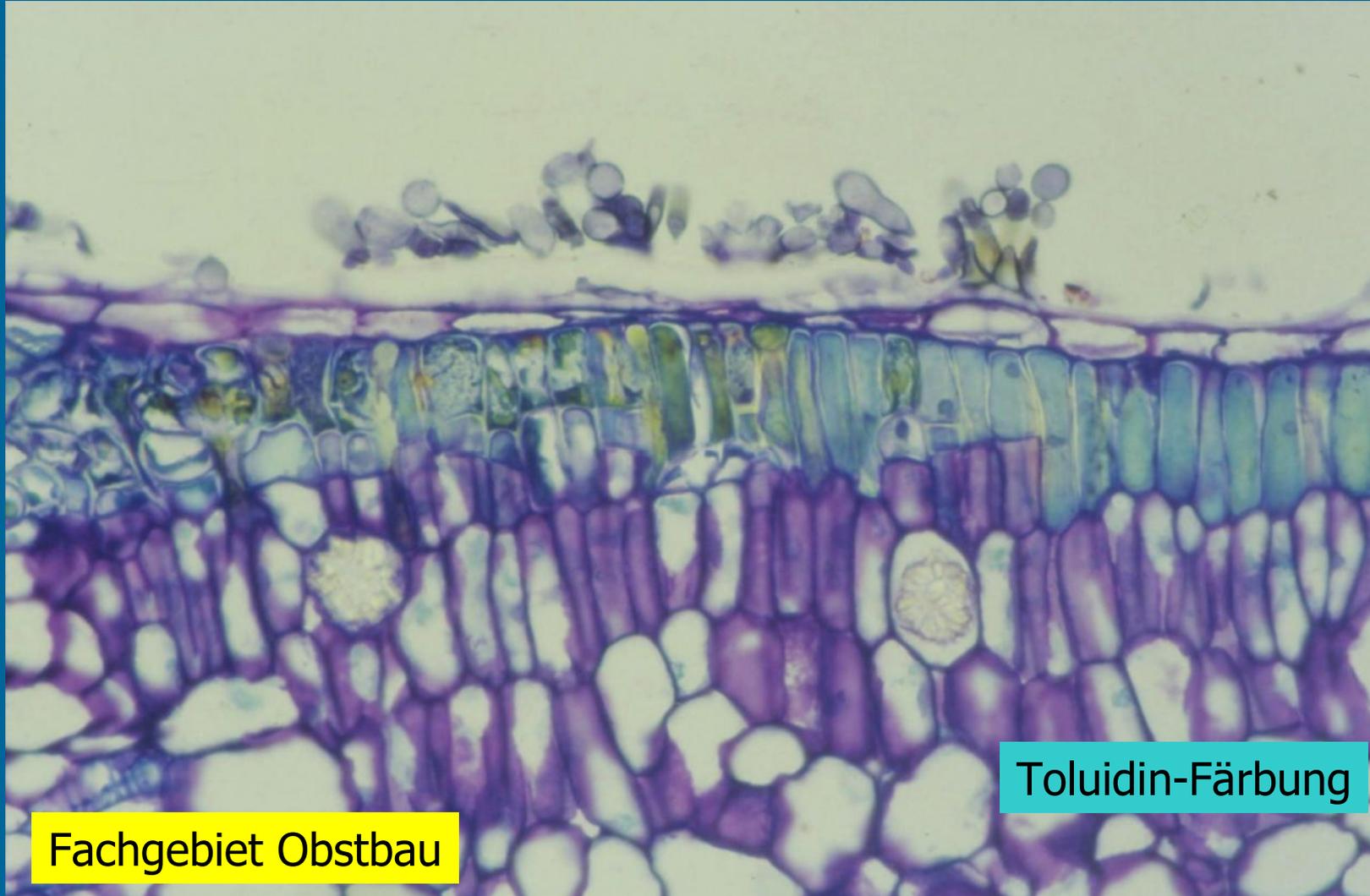
Abwehrreaktion in Palisadenparenchym nach Schorfinfektion



Fachgebiet Obstbau

DMAZA-Färbung

Abwehrreaktion in Palisadenparenchym nach Schorfinfektion



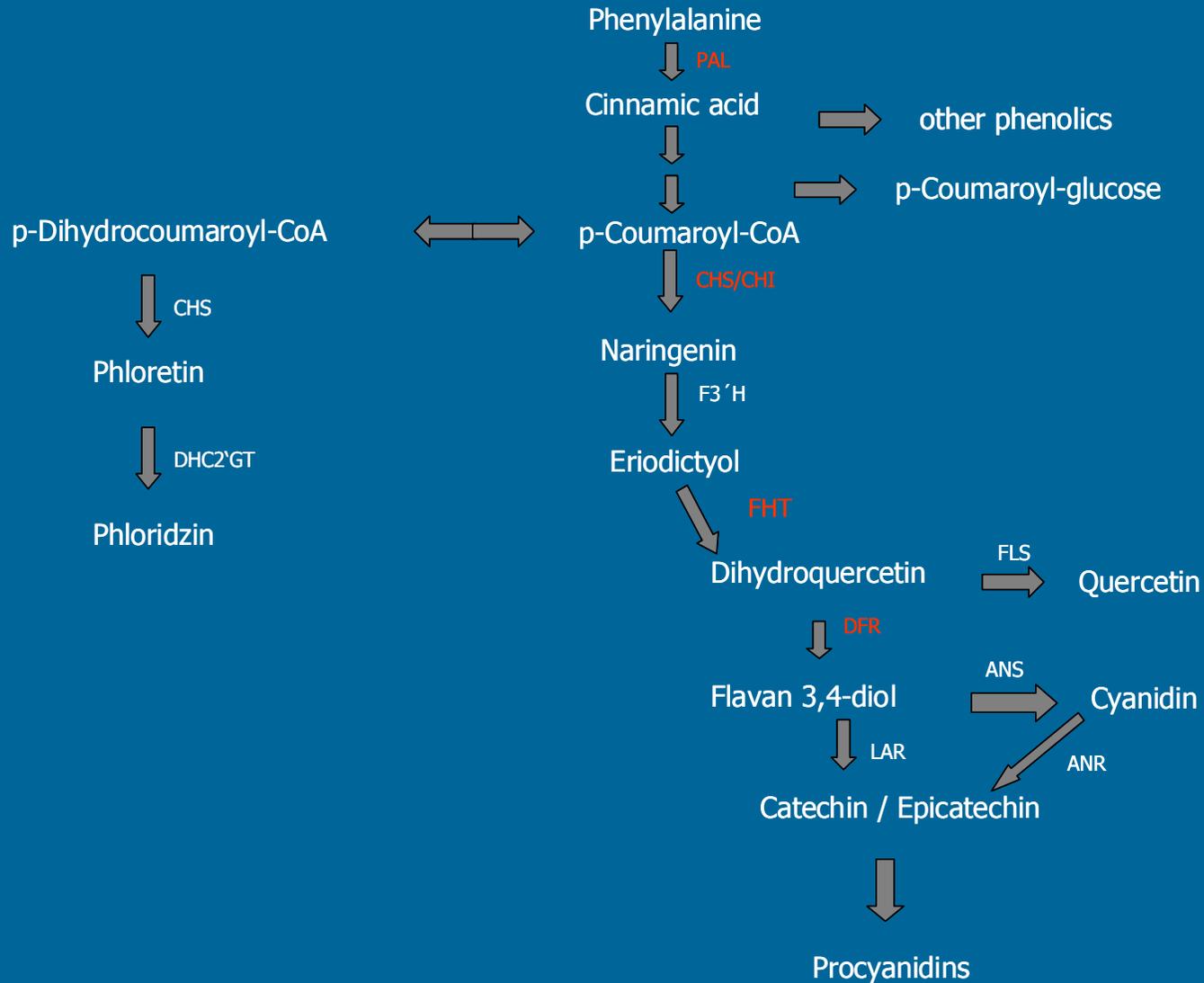
Toluidin-Färbung

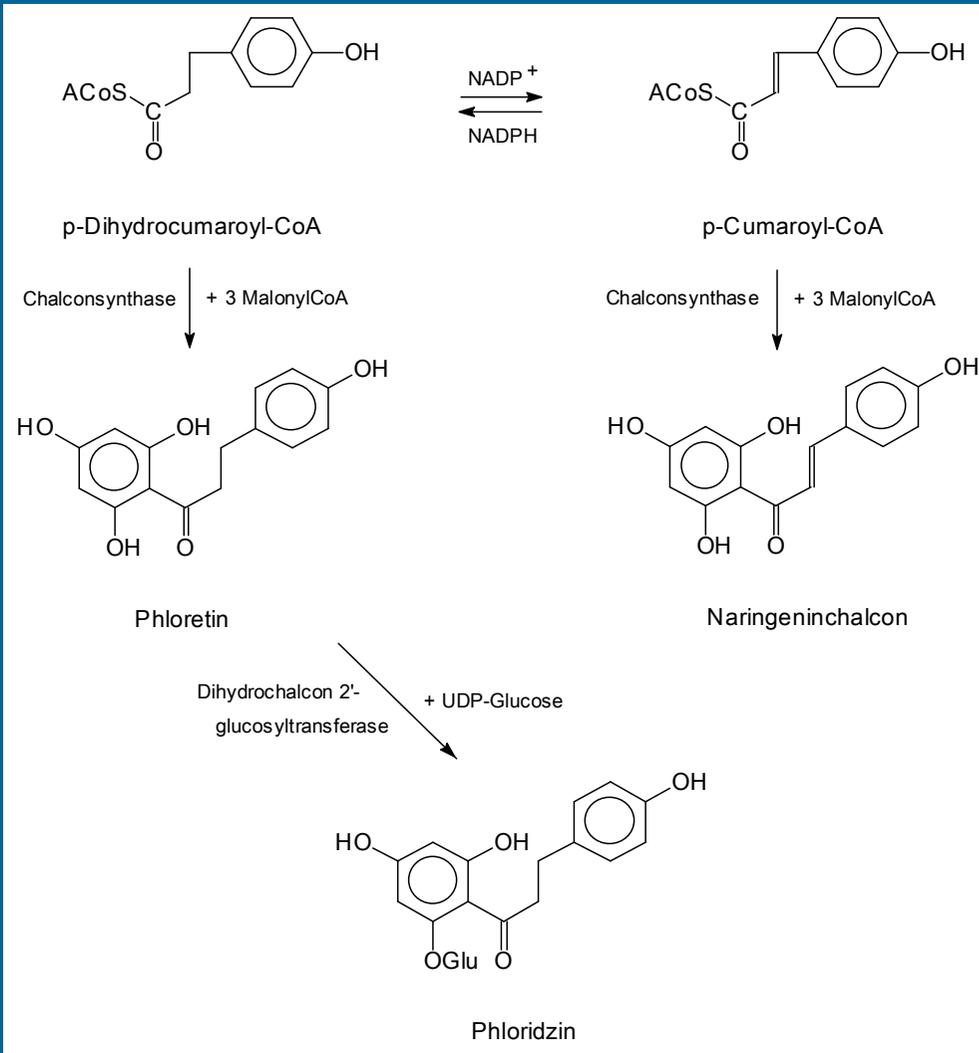
Fachgebiet Obstbau

Bedeutung von Phenolen für die Pathogenabwehr

- Phloridzin leistet einen Beitrag zur Resistenz
- Als Reaktion auf einen Pathogenbefall werden Phenole in die Zellwand eingelagert
- Hoher Flavan-3-ol-Gehalt korreliert mit Schorfresistenz

Biosynthese der Polyphenole



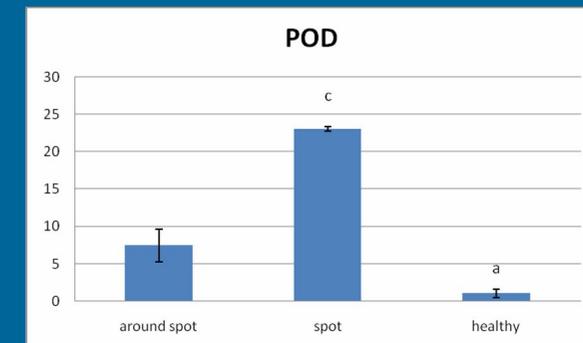
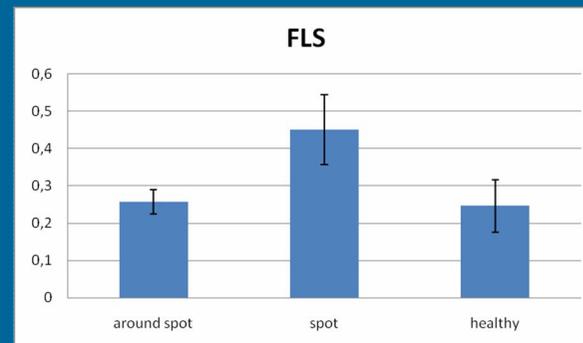
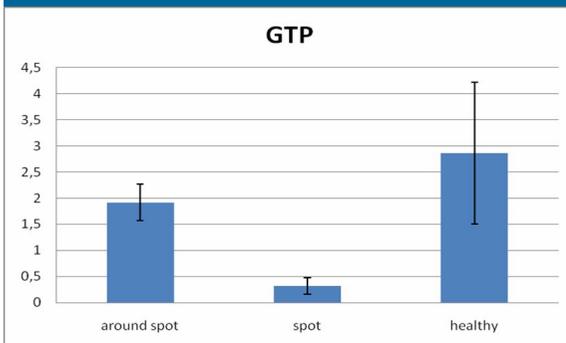
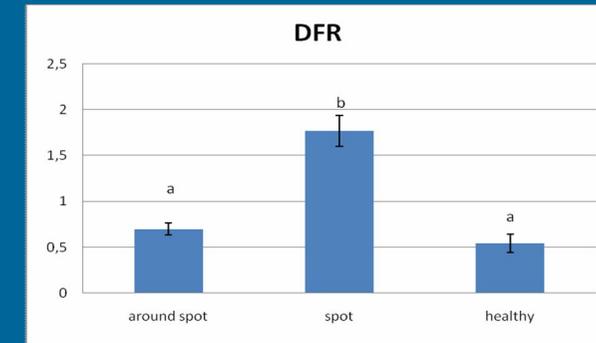
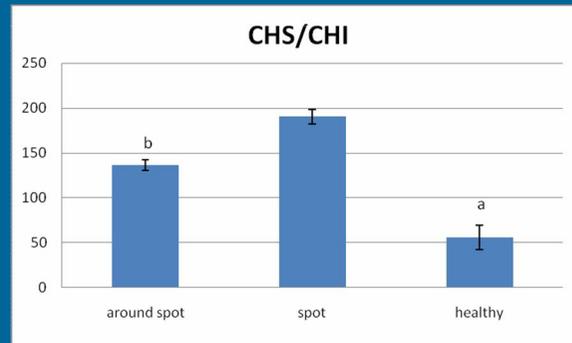
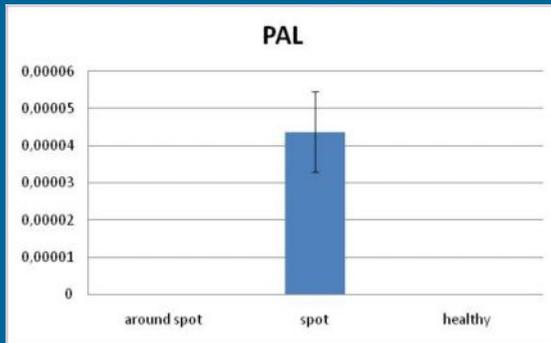


Dihydrochalcon- Biosynthese

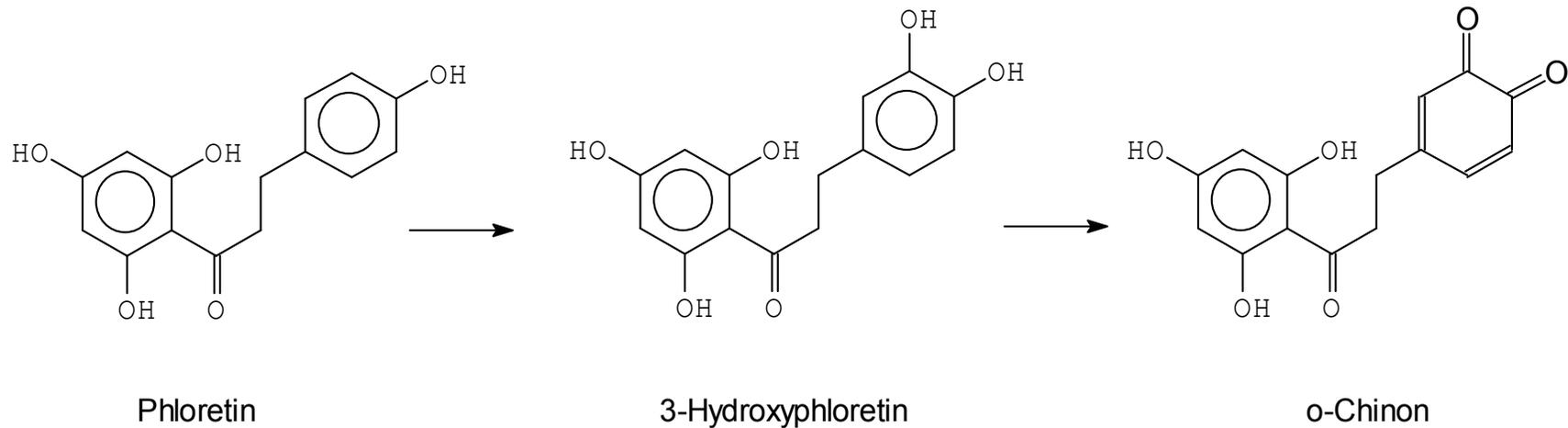


Schorfbefallsstelle

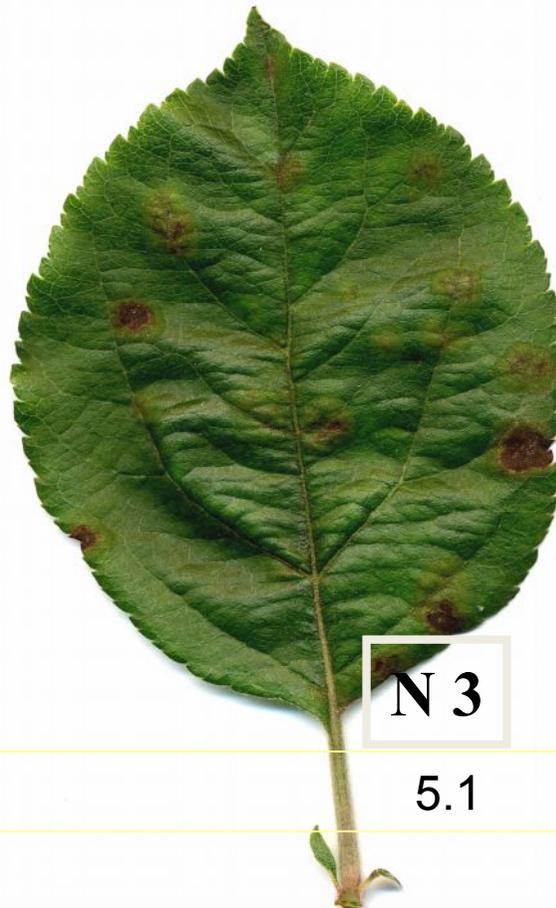
	around spot	spot	healthy
<i>p</i> -Coumaric acid	1.66 ± 0.51	3.23 ± 1.50	2.24 ± 0.31
chlorogenic acid	2.14 ± 0.24b	10.13 ± 0.42c	0.87 ± 0.11a
caffeic acid	1.48 ± 0.18	1.54 ± 0.20	1.35 ± 0.11
ferulic acid	0.04 ± 0.01a	0.24 ± 0.05b	0.05 ± 0.01a
epicatechin	27.09 ± 3.93a	35.00 ± 0.27b	23.06 ± 1.47a
catechin	2.42 ± 0.50a	7.95 ± 1.07b	2.73 ± 0.70a
procyanidin B2	36,97± 1,71	46,43± 3 ,81	39,53 ± 3,09
phoridzin	181.40 ± 57.25	192.54 ± 20.06	174.75 ± 31.14
phloretin	n.d.	0.001 ± 0.00002	n.d.
rutin	0.37 ± 0.17	0.29 ± 0.14	1.00 ± 0.40
total quercetin	238,32 ± 38,04	147,89 ± 7,03	210,55 ± 24,61



Enzymatische Oxidation von Phloretin

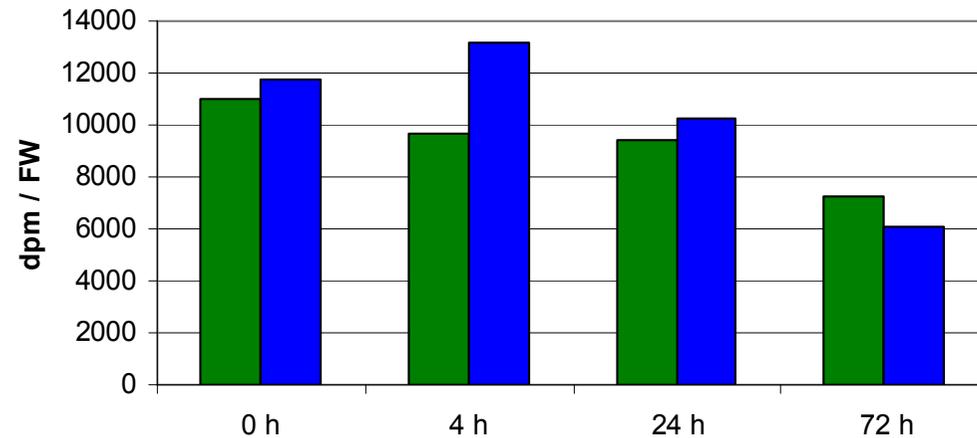


Einfluß der N-Düngung auf die Schorfanfälligkeit

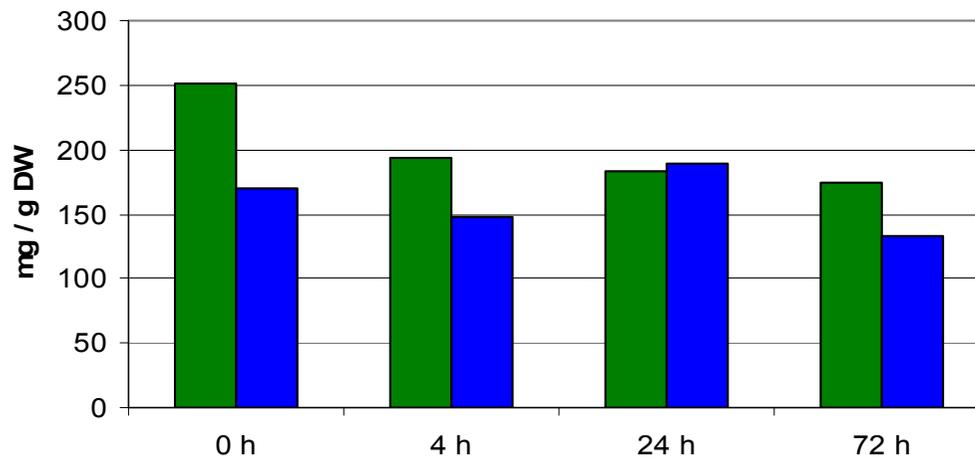


 low nitrogen
 high nitrogen

PAL-Activity of Young Leaves



Total Phenolics of Young Leaf



Einfluß der
Stickstoffdüngung
auf die PAL-Aktivität
und den Gehalt an
phenolischen
Inhaltsstoffen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

FEUERBRAND





TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

Bienen-*Erwinia*- Monitoring (BEM)

Projektziele

- Nutzung von Bienenvölkern für *E.a.*-Monitoring mittels Flugloch-Teststreifen (Alternativen dazu: Pollenhöschen, Bienen)
- isothermale DNA-Analytik (Entwicklung, Optimierung, Praxiseinführung)
- Vergleich der isothermalen Methode mit konventionellen Methoden und rt-PCR
- Rasche Erregerquantifizierung
- Rückmeldung über Infektionsstatus an Obstbauern
- Einbindung in MARYBLYT-Prognosesystem als Entscheidungshilfe für Umfang und Art der Bekämpfungsmaßnahmen
- Risikomodellierung
- Praktikables System einer zeitlich und regional gezielten Feuerbrandprognose

Neuheiten und Vorteile

Quantitative Aussagen über zeitliches Vorkommen von E.a. im Monitoringgebiet könnte zusätzliche Entscheidungskriterien für Pflanzenschutzmaßnahmen liefern, die sich bisher auf temperatur- und feuchteabhängige Parameter stützen (z.B. MARYBLYT)

Projektpartner AGES

- Entwicklung eines Monitorsystems – insbesondere Trägermedien
- Validierung Trägermedium – Wiederfindungsraten
- Überlebensraten von E. a.
- Nachweisempfindlichkeit
- Prototypentest und E. a. Monitoring im Feldversuch

Projektpartner AGES

- Weiterentwicklung rt-PCR Analysen zum Nachweis von E. a. in verschiedenen Matrizes
- Implementierung des Bienenmonitorings in bestehende Warndienstmodelle, Validierung durch Freilandversuche und Risikomodellierung

- Vergleichender Praxiseinsatz von Röhrenkollektoren an verschiedenen Standorten

Versuchsorte 2011

- Gamling (Stmk)
- Haidegg (Stmk)
- Puch (Stmk)
- Lustenau (Vlbg)
- Einbindung von Imkern, Obstbaubetrieben, FO-Einrichtungen (Haidegg) und anderen laufenden Versuchen (Interreg) zu Feuerbrand

- je 3 Bienenvölker/Standort
- zeitgleicher Einsatz von je 2 Röhrenkollektoren/Volk
- Kollektormedium: Kunststoff-Folie
- Versuchszeitraum: Kernobstblüte
- Probenlagerung: tiefgekühlt am Obstbau betrieb bis zur Abholung bzw. zum Versand
- *E.a.*-Nachweis mittels rt-PCR: Institut für Pflanzengesundheit (AGES)

Bienen-Erwinia-Monitoring Lustenau 2011



Versuchsstand: Völkerbereitstellung, -betreuung: Imkerei Neuhauser;
Betreuung der Versuchseinrichtungen, Probenahmen: Obstbaubetrieb
Alge; Unterstützung durch Vorarlberger Imkerverband (Dr. Gmeiner),
LK-VIbg (DI Höfert)

Bienen-Erwinia-Monitoring Gamling 2011



Versuchsstand, Bienen, Obstanlage, Versuchseinrichtungen:
zur Verfügung gestellt bzw. betreut vom Imker und
Obstbauern, Hrn. Bischof
Wetterdaten: bereitgestellt von der Landes-Wetterstation

Bienen-Erwinia-Monitoring Puch 2011



Versuchsstand, Betreuung, Probenahmen:
Obstbauer und Jungimker, Hr. Kalcher.

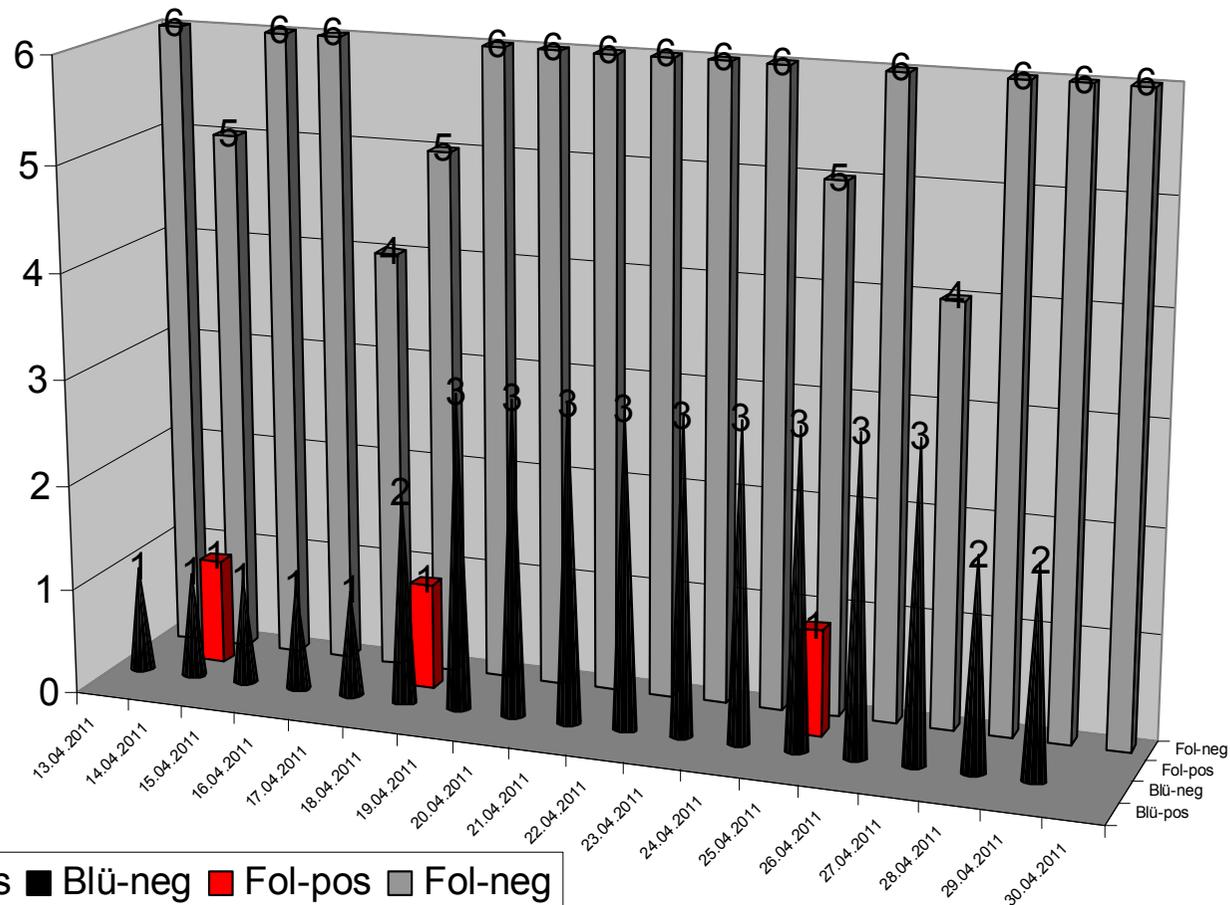
Bienen-Erwinia-Monitoring Haidegg 2011



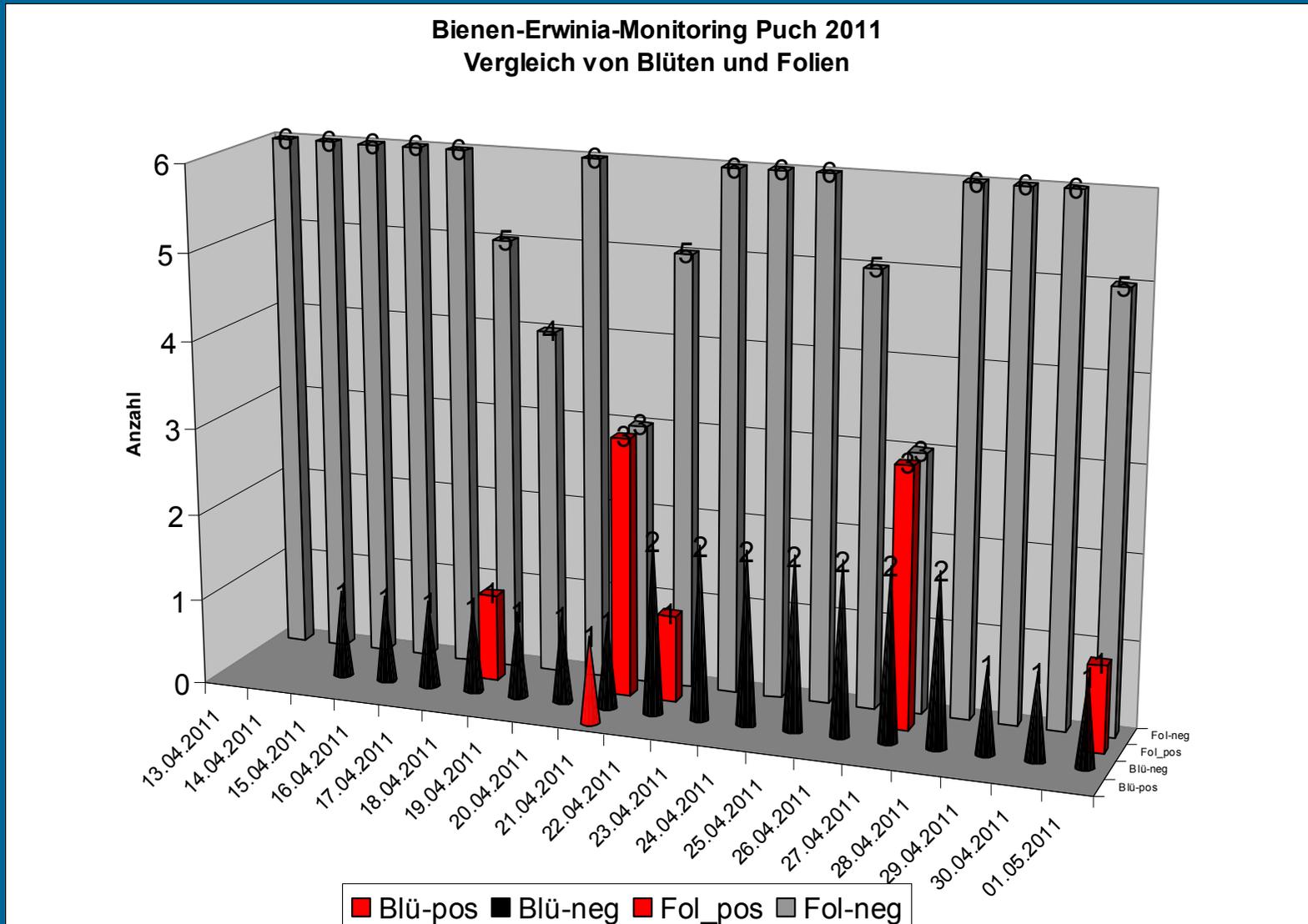
„Ersatzflugloch“: Die Fluglochblende aus Hartschaumstoff wurde von den Bienen an der Ober- und Unterkante angeknabbert

Bienen-Erwinia-Monitoring Gamling 2011

Bienen-Erwinia-Monitoring Gamling 2011
Vergleich von Blüten und Folien

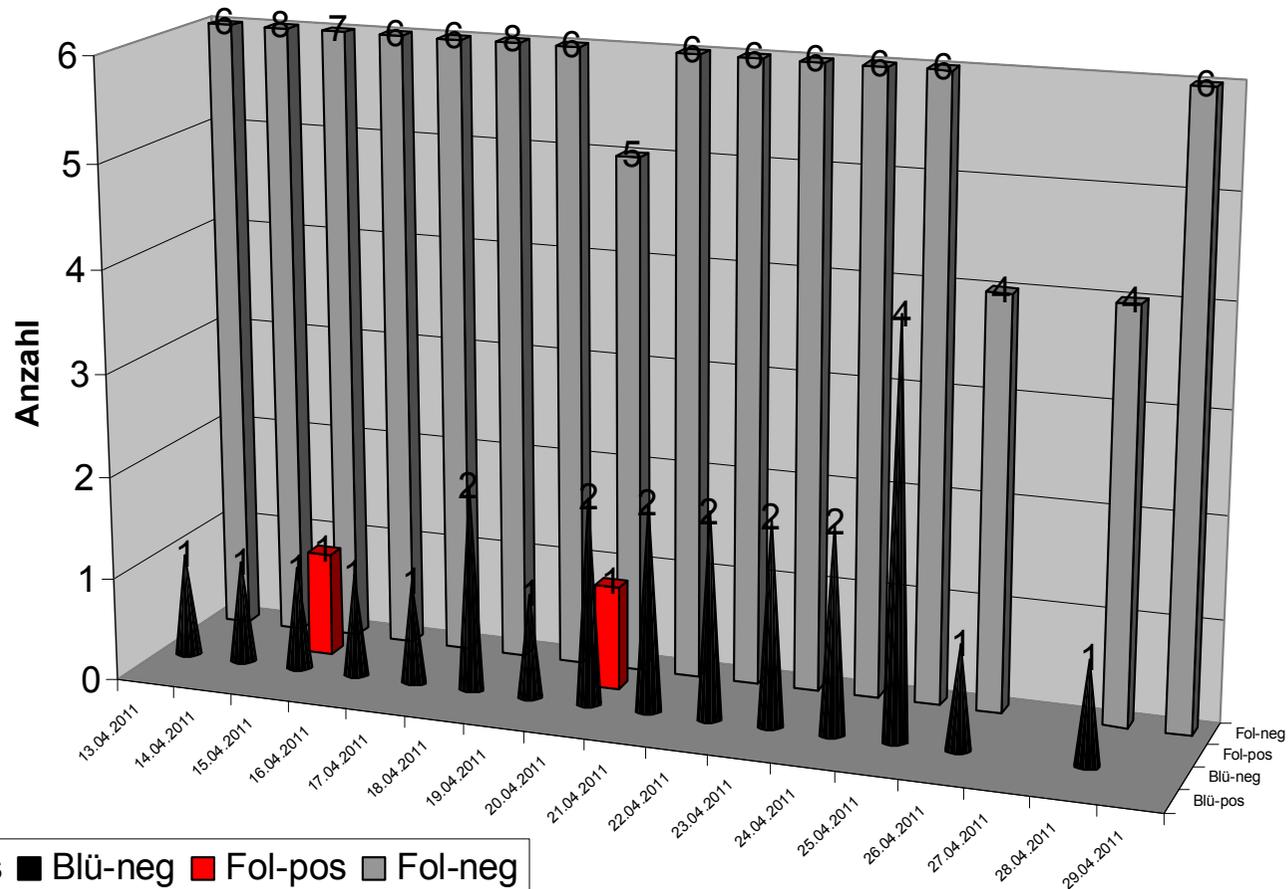


Bienen-Erwinia-Monitoring Puch 2011



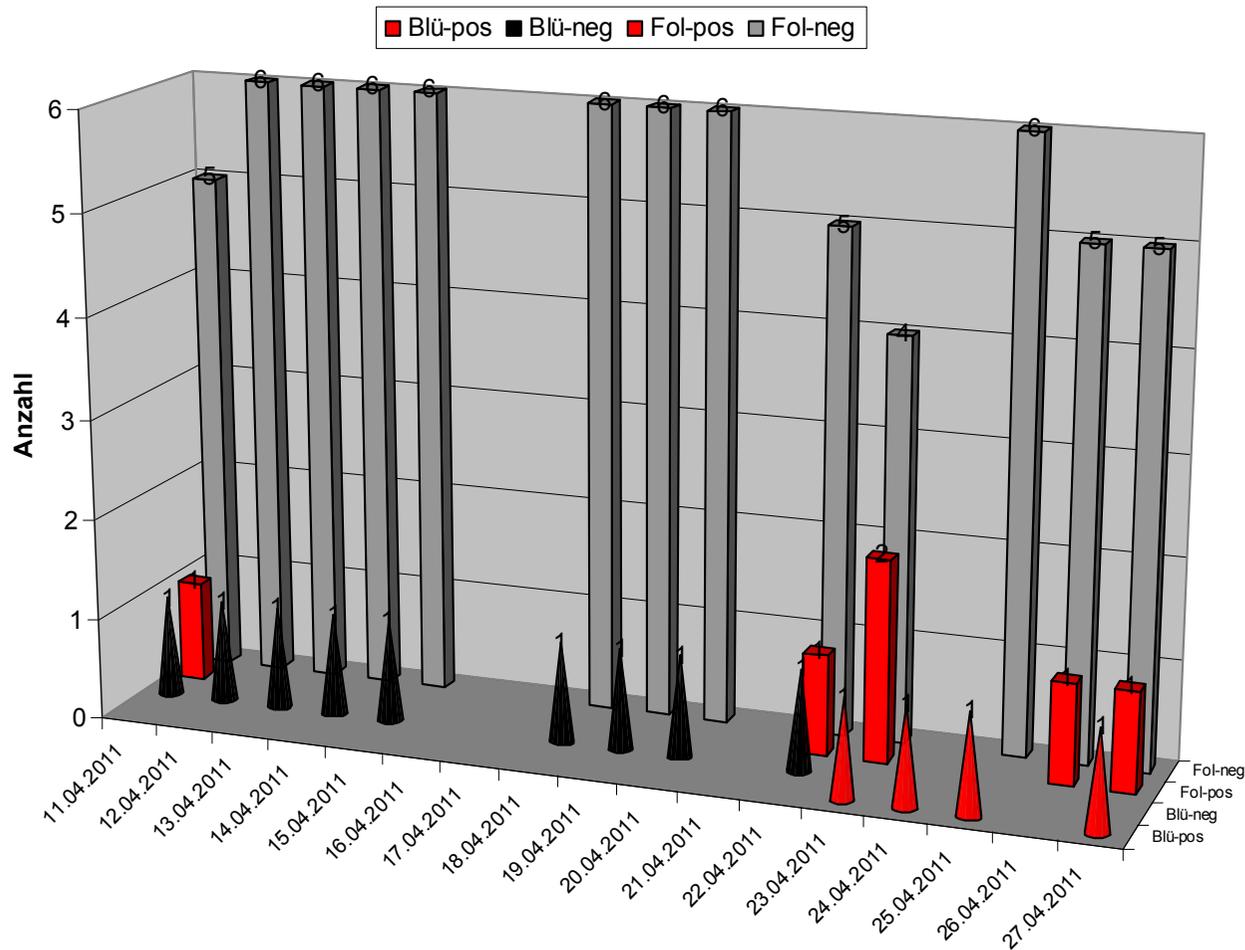
Bienen-Erwinia-Monitoring Haidegg 2011

Bienen-Erwinia-Monitoring Haidegg (frei) 2011
Vergleich von Blüten und Folien



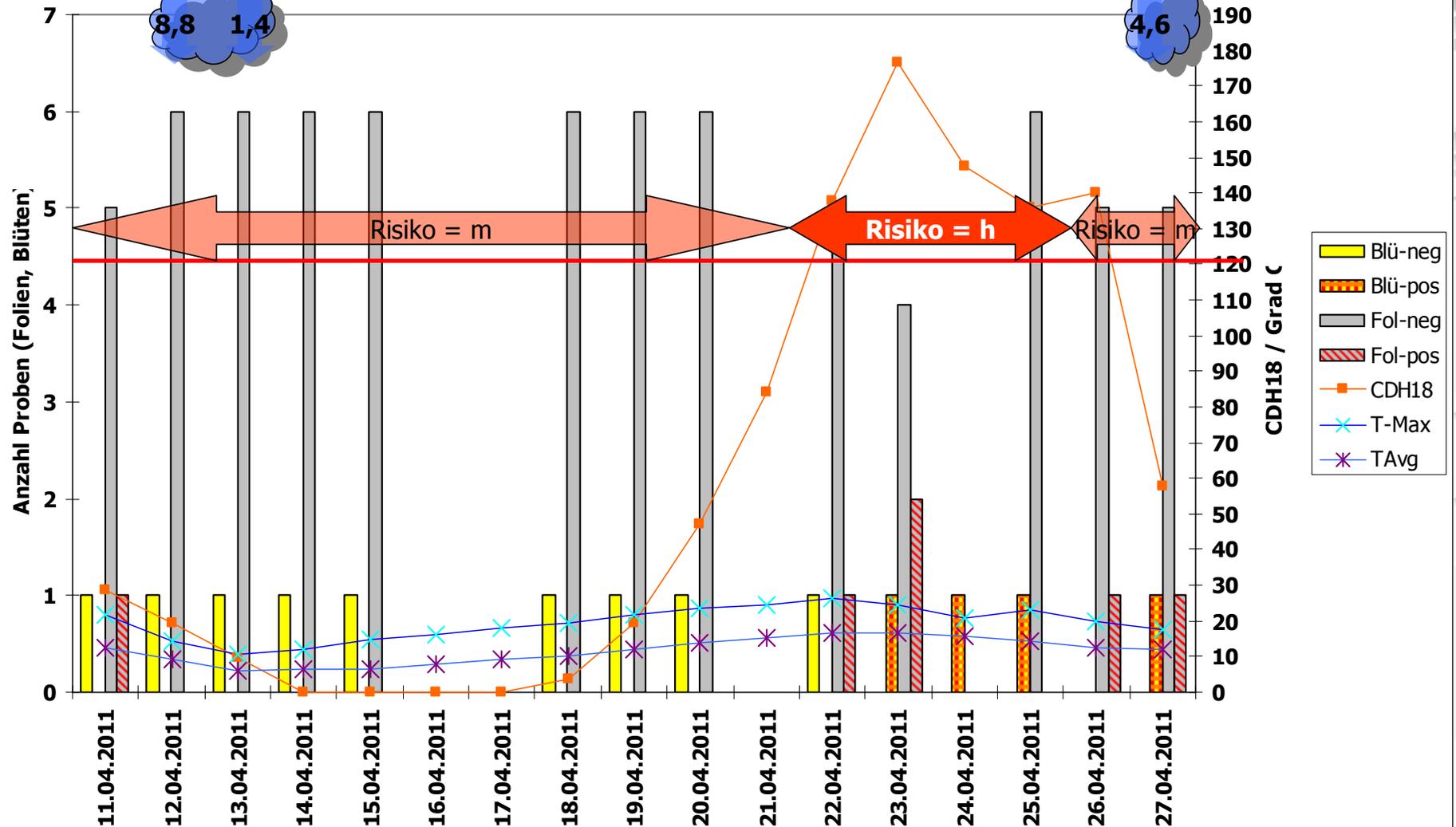
Bienen-Erwinia-Monitoring Lustenau 2011

**Bienen-Erwinia-Monitoring Lustenau 2011
Vergleich von Blüten und Folien**



Bienen-Erwinia-Monitoring Lustenau 2011

Apfelblüte: 10.4.-29.4.



Bienen-*Erwinia*-Monitoring (BEM) Zusammenfassung Freilandtests 2011

- Praxistests mit Kollektoren verliefen ohne Probleme für Bienenvölker
- Unterschiedliche Beuten- und Aufstellungsarten erforderten Anpassungen bei Montage der Röhrenkollektoren
- BEM lieferte Daten zum räumlichen und zeitlichen Vorkommen von *E.a.* im Flugkreis der Bienen
- BEM lieferte früher positive Signale für ein *E.a.*-Vorkommen im Beobachtungsgebiet als die Blütenproben
- Die Einbindung von BEM in *E.a.*-Prognose- bzw. Risikomodelle erfordert analytische Methoden, die sehr rasch Ergebnisse liefern.

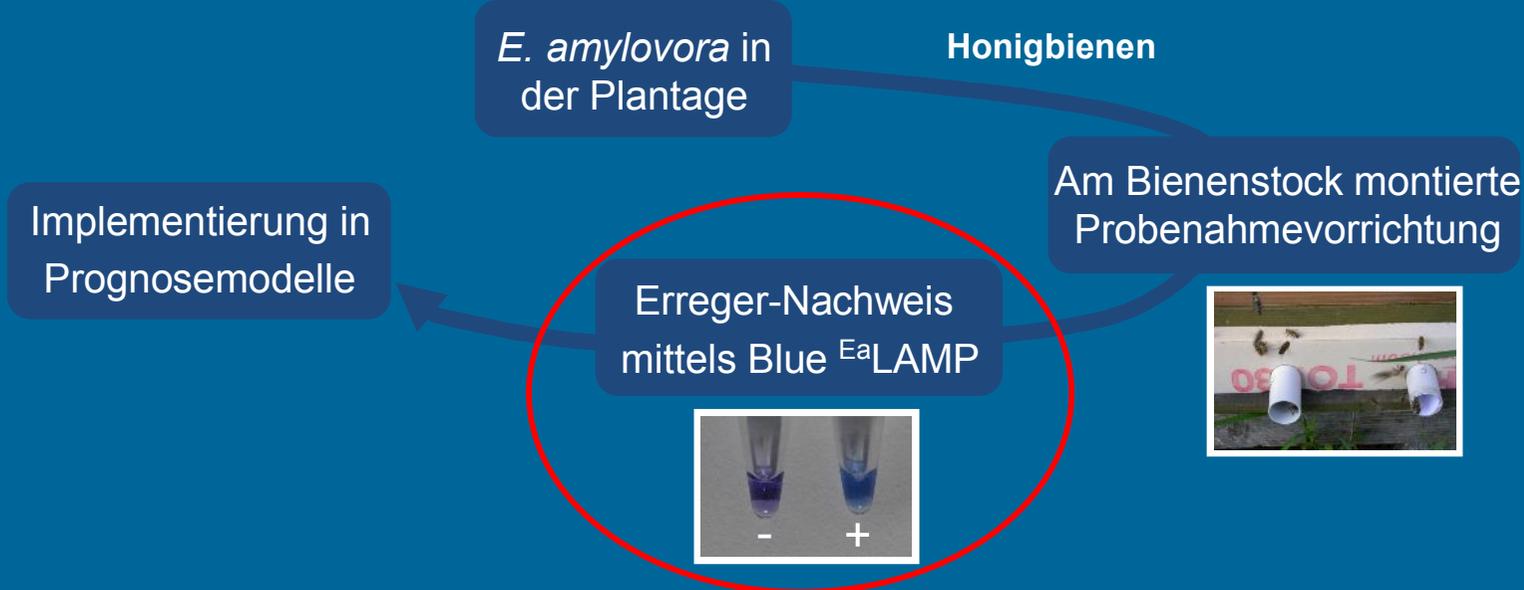


TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

Blue ^{Ea}LAMP als Methode zum *Erwinia*-Monitoring

Erwinia-Monitoring

Einfaches, schnelles und billiges System zum Nachweis des lokalen Erregerpotentials von *E. amylovora* während der Blüte.

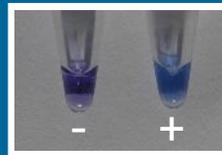


E. amylovora in der Plantage

Honigbienen

Am Bienenstock montierte Probenahmeverrichtung

Erreger-Nachweis mittels Blue ^{Ea}LAMP



Implementierung in Prognosemodelle

Erwinia-Monitoring



ZIEL

Präzisere Prognosemodelle

=

Präziserer PSM-Einsatz

(z.B. Vermeidung von Streptomycin oder Einsatz von Alternativen)

derzeitige Nachweismethoden

- qPCR, PCR: teuer, zeitaufwändig, geschultes Personal
- ELISA: geringe Sensitivität und Selektivität

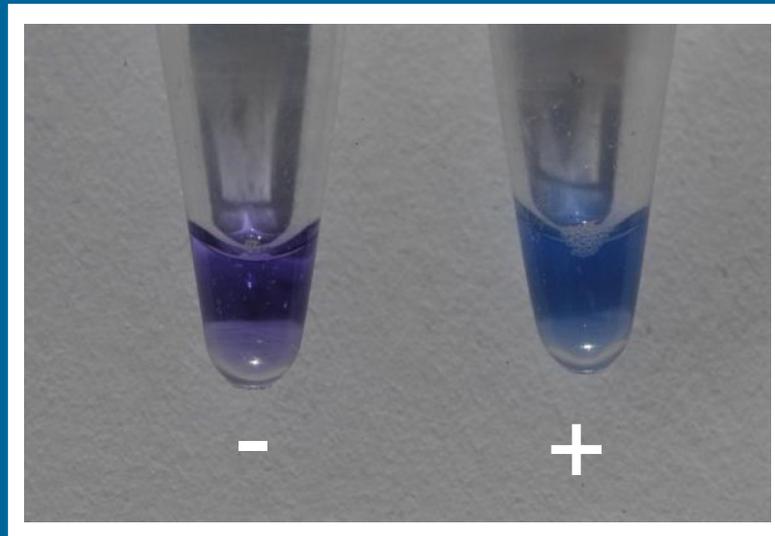
LAMP

Loop-mediated **amplification** of DNA (Notomi et al. 2000)

- isothermale Amplifikation (63-65 °C)
- Minimales Equipment (Heizblock statt Thermocycler)
- einfache Handhabung
- schnell und billig
- Hohe Sensitivität (DNA-Amplifikationsmethode)
- Hohe Spezifität (6 Primer für 8 Primerbindungsstellen)
- Visueller Nachweis der DNA-Amplifikation (Goto et al., 2009)

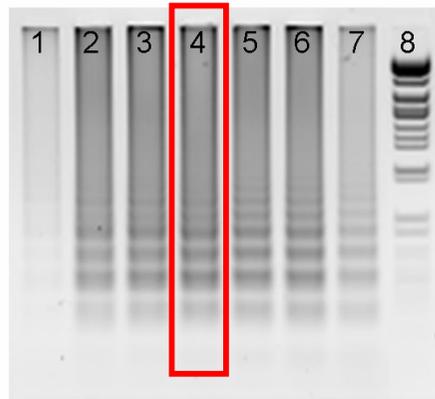
Blue ^{Ea}LAMP – einfacher visueller Nachweis

Farbumschlag positiver Reaktionen
mittels Hydroxynaphtholblau



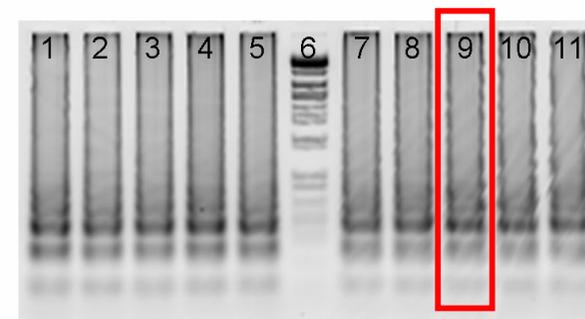
Blue^{Ea}LAMP – Optimierung (Bsp.)

Mg²⁺



Spuren 1-7: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
mM Spur 8: Marker

dNTPs



Spuren 1-5: 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3 mM
Spur 6: Marker
Spuren 7-11: 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 mM

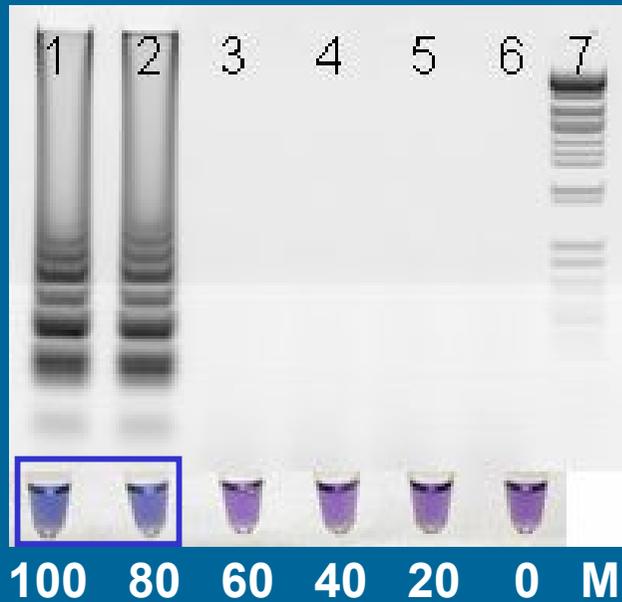
im Allgemeinen: Breite Optima. Assay dadurch
robuster?

Blue ^{Ea}LAMP - Selektivität

- mehr als 60 *Erwinia amylovora*-Isolate nachweisbar
- Ziel-DNA = genomisch
 - dh. auch pEA29-plasmidfreie Stämme detektierbar
- keine Kreuzreaktionen mit
 - Malus x domestica*
 - Pyrus communis*
 - Homo sapiens*
 - Apis mellifera*
 - Pantoea agglomerans*
 - Erwinia pyrifoliae*, *E. persicina*, *E. piriflorinigrans*, *E. tasmaniensis*, *E. billingiae*
 - Bacillus licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis ssp. subtilis*
 - Staphylococcus aureus*

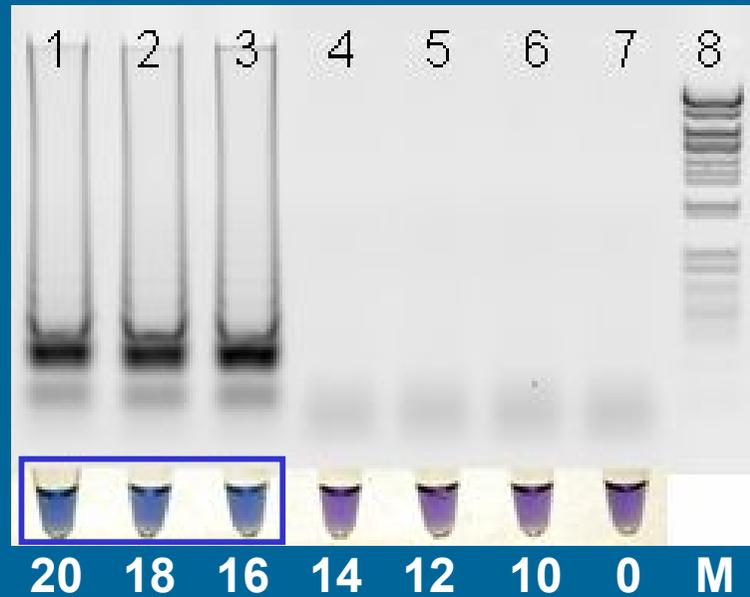
Blue ^{Ea}LAMP - Sensitivität

isolierte DNA



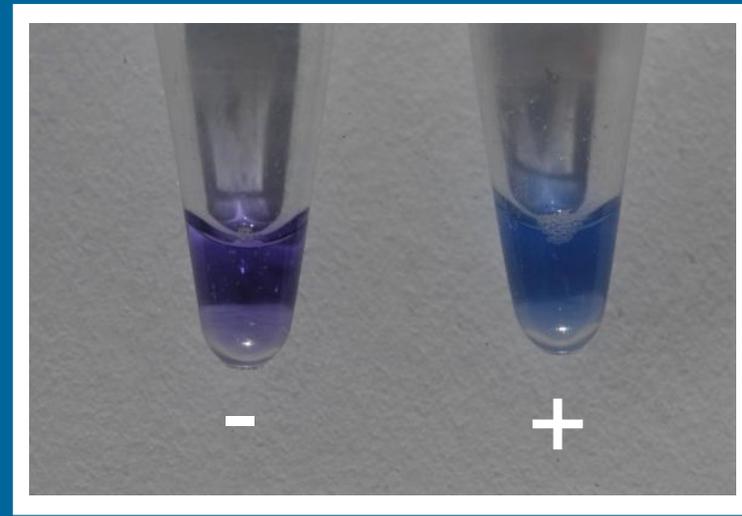
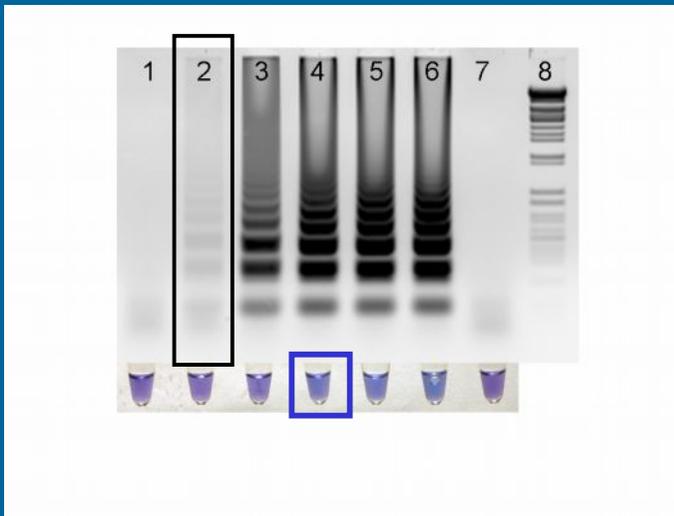
Nachweisgrenze
80-100 fg DNA
=20-25 Bakterien

Bakterienzellen



Nachweisgrenze
16-20 Bakterien

Blue ^{Ea}LAMP - Schnelligkeit



Inkubationszeit (mit 10^4 cfu)

1: 10 min

2: 15 min

3: 20 min

4: 25 min

5: 30 min

6: 35 min

7: Negativkontrolle

Standard-Inkubationszeit = 45 min.

Blue ^{Ea}LAMP - Preis

- Verbrauchsmaterialien: 0,5 – 0,6 €
- Blockthermostat: ca. 300 €

Blue^{Ea}LAMP mit Freilandproben

- 227 Proben von 2010 und 2011
- Waschwasser von Einzelblüten, Blütenbüschel, 10, 100 Blüten
- qPCR (AGES): 28 Positivproben (1 - 4120000 cfu/μl)
- Blue^{Ea}LAMP (Blindstudie)
 - 24 Positivproben
 - 3 Proben unter der Blue^{Ea}LAMP Labor-NWG (ca. 20-25 cfu)
 - 1 Probe (167 cfu) nahe der Labor-NWG
 - = 1 - 4 falsch-negative Ergebnisse
 - keine falsch-positiven Ergebnisse

Ausblick

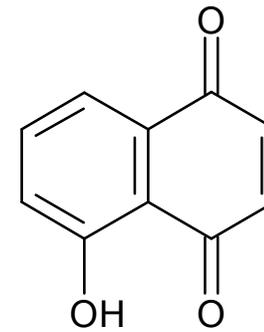
- Evaluierung der Praxistauglichkeit (Obstblüte 2012)
- Kombination mit Bienen-Monitoring
(Probensammlung mittels Kollektorröhrchen an Bienenstöcken)
- Implementierung in Prognosemodelle



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

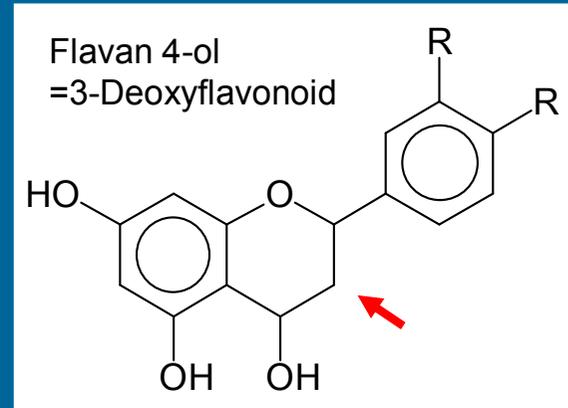
Status Quo zur Wirkung von Juglon und 3-Deoxyflavonoiden gegen Feuerbrand

Juglon



- natürlicher Inhaltsstoff z.B. der Walnuss
 >Nahrungsmittel, Kosmetik, Naturheilkunde
- allelopathische Funktion
- bakterizid in geringsten Konzentrationen

3-Deoxyflavonoide



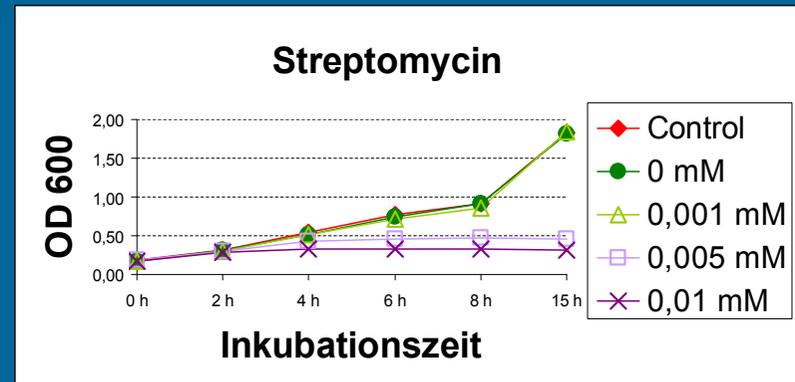
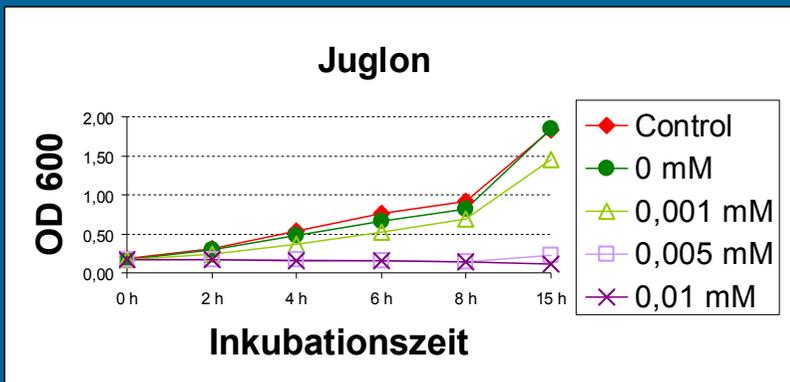
- z.B. Apiforol oder Luteoforol
(letzteres entsteht nach Pro-Ca-Behandlung, induzierte Resistenz gegen sekundäre Feuerbrandinfektionen)
- instabil
- Stabilisierung durch Schutzgruppe und Aktivierung unmittelbar vor der Applikation
- Herstellung aus z.B. *Citrus*-Abfällen

Testsysteme

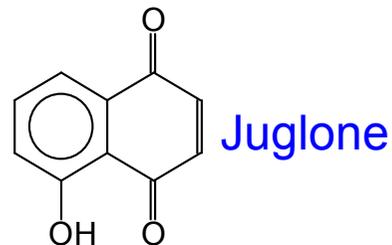
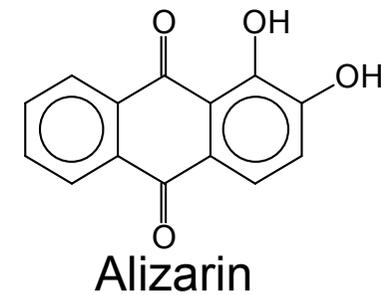
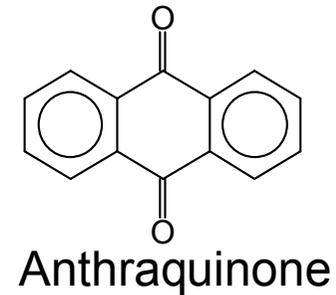
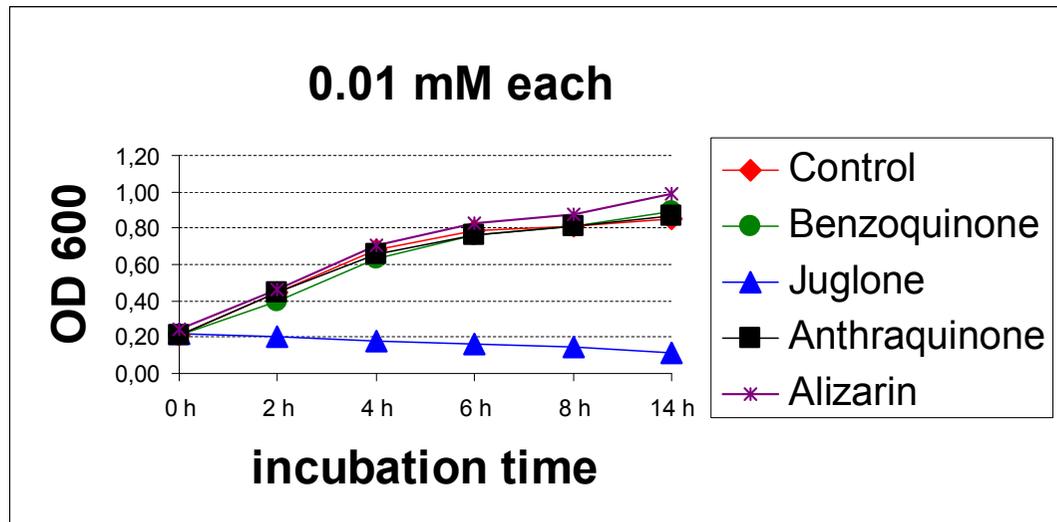
- Hemmtests in Flüssigkultur
- Einzelblüten-Inokulationstests
- Feldversuche mit künstlichen *Erwinia*-Infektionen



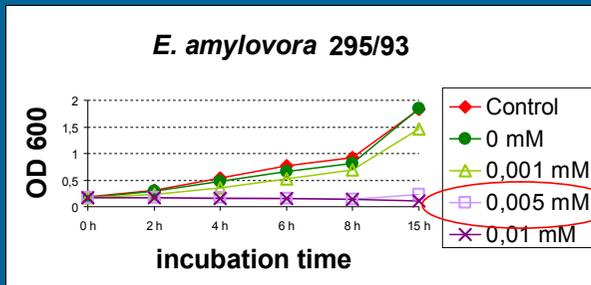
Juglon - Hemmtests in *E. amylovora*-Flüssigkultur



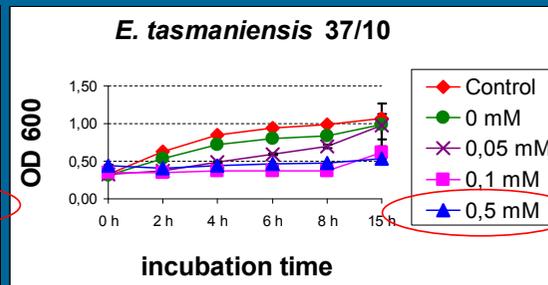
Wirkung verschiedener Chinone



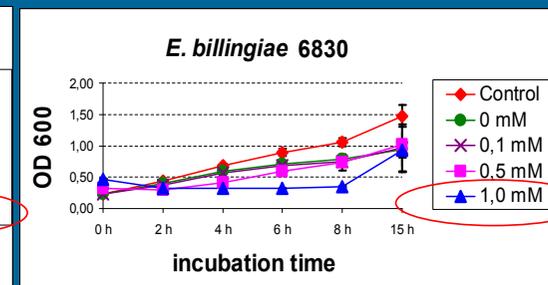
Juglon + diverse Mikroorganismen



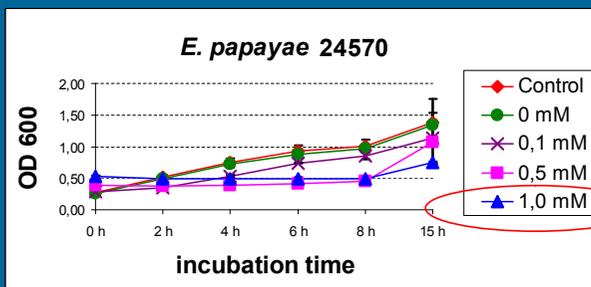
MIC = 0,005 mM



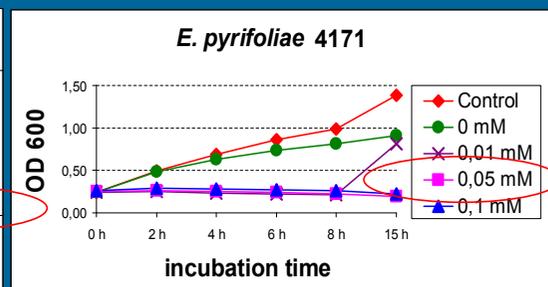
MIC = 0,5 mM



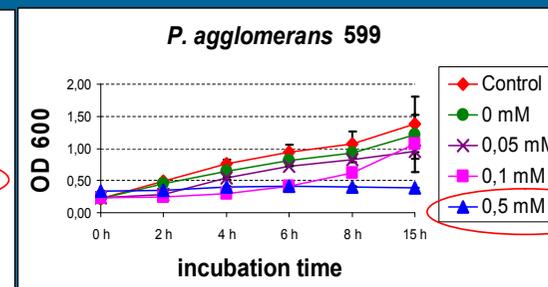
MIC > 1 mM



MIC > 1 mM



MIC = 0,05 mM



MIC = 0,5 mM

Einzelblüten-Inokulationstests

verändert von K. Marschall in Anlehnung an Pusey (1997)



Apfel-Einzelblüten
in Plastikboxen



0 h: Blüteninokulation
(10^4 cfu)



3 h: Wirkstoff-
Applikation mit
Pumpzerstäuber



35-40 h:
Nässeereignis



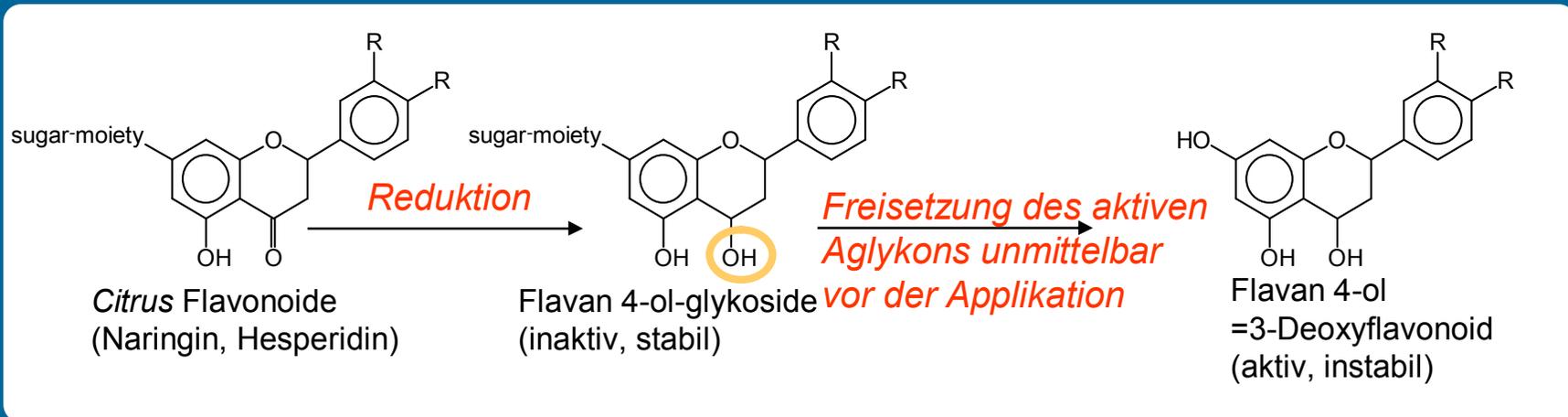
Manchmal ist
Baktérienschleim
sichtbar



7-10 d: Auswertung

3-Deoxyflavonoide (Einzelblüten-Inokulationstests)

- durchschnittlich 73 % Wirkungsgrad
(MW aus 7 Versuchen; min: 53 %, max: 87 %)
- Optimierungsbedarf bei Synthese und Applikation



Juglon, 3D-Flavonoid – Freilandtests (vektorgestützte Blüteninokulation)

	Wirkungsgrad			Befallsgrad (unbehandelt)
	Juglon	3D- Flavonoid	Stepto	
KOB (Vogt)	82 %	48 %	95 %	12 %
KOB (Mühlingen)	40 %	-	78 %	10 %
Haidegg (voll eingenetzt)	26 %	-	67 %	31,4 %

Juglon, 3D-Flavonoid – Freilandtests (Hagelsimulation, KOB)

Variante	Nekroselänge (cm)
unbehandelt	10,3
Juglon (hell)	2,7
Juglon (dunkel)	4,7
3D-Flavonoid	4,4
Strepto	0,2

Juglon – Zusammenfassung

- schwankende Wirkungsgrade
 - UV-Strahlung?
 - Abbau auf der Blüte?
 - Fazit: bei geringer Sonnenstrahlung anwenden?, spezielle Formulierungen?
- bakterizid, nicht bakteriostatisch
- keine Berostung an Äpfel und Birnen
- nicht bienengefährlich (vorläufige Tests)
- Toxizität?
- in der Praxis: Pflanzenextrakte, Derivate?
- Weiterentwicklung in Kooperation mit Firmen

3D-Flavonoide - Zusammenfassung

- potentieller Wirkstoff gegen Feuerbrand
- Optimierungs- und Evaluierungsbedarf für den Praxiseinsatz (Synthese und Wirkstoff-Freisetzung)
- derzeitige 3D-Flavonoide = Leitsubstanzen, ggf. bessere Derivate?



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology

Danke für die Aufmerksamkeit!

Kontakt: TU Wien, AG Phytochemie (Univ.-Prof. Dr. Stich)
Getreidemarkt 9-166/5, 1060 Wien
www.vt.tuwien.ac.at



Prof. Karl Stich (Projektleiter, kstich@mail.zserv.tuwien.ac.at)
Dr. Christian Gosch (christian.gosch@tuwien.ac.at)
Prof. Thilo Fischer (thilo.fischer@biologie.uni-muenchen.de)

Projektfinanzierung: BMLFUW und Bundesländer (DaFNE Nr. 100404)
Interreg IV – Gemeinsam gegen Feuerbrand
Prototypenförderung PRIZE 2010 (BMWFJ und AWS)

Kooperation:



DI U. Persen
Dr. R. Moosbeckhofer
Mag. H. Reisenzein
Dr. R. Gottsberger