

**Mayer M. - Oberhuber C. - Loncaric I. - Heissenberger B. - Keck M. - Scheiner O. -
Hoffmann-Sommergruber K.**

Nachweis von stress-induzierbaren Allergenen in Äpfeln von Bäumen mit Feuerbrandinfektion

Einleitung

Äpfel gehören zu den europaweit am häufigsten konsumierten Früchten und stellen eine wichtige Quelle an Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen in der Ernährung der Bevölkerung dar. Groben Schätzungen zufolge sind jedoch bis zu 2% der Nord- und Mitteleuropäer Apfelallergiker¹. In der Fachliteratur sind zurzeit 4 verschiedene Allergene im Apfel (*Malus domestica*) beschrieben: Mal d 1^{2,3}, Mal d 2⁴, Mal d 3⁵ und Mal d 4⁶⁻⁸. Die einzelnen Apfelallergene haben für die Patientengruppen aus Süd-, Mittel-, und Nordeuropa eine unterschiedliche Bedeutung. Es wurde festgestellt, dass Mal d 1 ein Hauptallergen für die allergischen Patienten in Nord- und Mitteleuropa darstellt^{9,10}, Mal d 3 hingegen ein Nahrungsmittelallergen repräsentiert, das präferentiell von Patienten aus Südeuropa erkannt wird^{5,11}. Die Apfelallergene Mal d 1, Mal d 2 und Mal d 3 gehören zu verschiedenen Familien der „pathogenesis-related proteins, Mal d 4 hingegen ist ein Mitglied der cytoskelettassoziierten Proteinfamilie der Profiline, die durch Pathogenbefall nicht vermehrt exprimiert werden.

"Pathogenesis-related Proteins" (PR-Proteine)

Höhere Pflanzen schützen sich vor verschiedenen Stressfaktoren durch Änderung ihres physiologischen Zustandes. Diese Abwehrreaktionen sind auch bekannt als „Verteidigungsmechanismen“, und die daraufhin synthetisierten Proteine werden "pathogenesis-related proteins" genannt. PR-Proteine sind definiert als 5-70 kDa kleine Proteine, die vom Pflanzengenom kodiert werden. Sie lassen sich aufgrund von DNA-Sequenzähnlichkeiten, immunologische und enzymatische Eigenschaften in 17 Familien unterteilen, unabhängig von der Pflanzenspezies¹². Viele wichtige Pollen- und Nahrungsmittelallergene aus verschiedenen Pflanzenfamilien wie z. B. Betulaceae, Rosaceae, Apiaceae und Fabaceae sind PR-Proteine^{13,14}. Das Apfelallergen Mal d 1 ist ein Mitglied der Familie 10 der "pathogenesis-related proteins". PR-Proteine werden als Antwort auf Pathogenbefall (Pilze, Bakterien oder Viren), durch physikalischen Stress, oder durch

verschiedenste Umwelteinflüsse (Kälte, Austrocknung, Ozonbelastung) vermehrt produziert¹⁵⁻²⁰. Alle diese Faktoren könnten den Gehalt dieser PR-Proteine und damit auch den Grad der Allergenizität beeinflussen.

Feuerbrand (Erwinia amylovora-Infektion)

Feuerbrand, hervorgerufen durch das stäbchenförmige Enterobakterium *Erwinia amylovora*, gilt derzeit als eine der wichtigsten und gefährlichsten Krankheiten des Kernobstes und nahe verwandter Zier- und Wildgehölze aus der Familie der Rosaceen. Zu den Hauptwirtspflanzen zählen Apfel (Malus), Birne (Pyrus), Quitte (Cydonia), Vogelbeere (Sorbus), Mispel (Mespilus), Zwergmispel (Cotoneaster), Weissdorn (Crataegus), Zierquitte (Chaenomeles) und Wollmispel (Eriobotrya)²¹. Als besonders anfällige Hauptwirtspflanzen gelten Arten aus der Unterfamilie der Kernobstgewächse (Pomoideae, Maloideae). Auf Grund seiner Gefährlichkeit wird der Feuerbrand als Quarantänekrankheit eingestuft. Für die Gesundheit des Menschen besteht durch diese Pflanzenseuche jedoch keine Gefahr. Feuerbrand infiziert hauptsächlich die Blüten und Triebspitzen der Bäume, in weiterer Folge werden Äste und in seltenen Fällen die Früchte selbst befallen. Die Krankheit trat zum ersten Mal vor etwa 200 Jahren in Amerika auf und erreichte Europa im Jahre 1957, wo sie sich von England aus über den gesamten Kontinent verbreitete^{22,23}. Feuerbrand wurde in Österreich erstmals 1993 in Vorarlberg nachgewiesen²⁴. In den Folgejahren kam es zu einem deutlichen Fortschreiten des Feuerbrandes in Richtung Südosten des Bundesgebietes, so dass letztlich in allen Bundesländern Infektionsherde festgestellt wurden²⁵.

Ein Eindringen der Bakterien in das Pflanzengewebe erfolgt während des aktiven Wachstums der Pflanze über natürliche Eintrittspforten wie Blüten, Stomata, Lentizellen und Nektarien oder über Wunden an Blättern, Trieben oder Zweigen. Die Verbreitung der Krankheit erfolgt sowohl durch Blüten- als auch durch Triebspitzeninfektion. Infizierte Blüten und befallene Triebe verfärben sich dunkelbraun bis schwarz. Die Triebspitzen krümmen sich auf Grund des Wassermangels hakenförmig. Das wichtigste Krankheitsmerkmal ist der bei feuchtwarmer Witterung austretende hochinfektiöse Bakterien Schleim. Diese Bakterien Schleimtropfen werden durch Insekten, Wind, Regen, Vögel und den Menschen auf andere Wirtspflanzen übertragen. Die chemische Bekämpfung von Feuerbrand beschränkt sich derzeit auf wenige Wirkstoffe. Zur Prävention von Blüteninfektionen gilt das Antibiotikum Streptomycinsulfat am wirksamsten. Sein Einsatz wird in Österreich äußerst restriktiv gehandhabt. Antibiotikabehandlungen können Neuinfektionen verhindern, allerdings kann die wiederholte Verwendung von Streptomycinsulfat zum Auftreten von antibiotika-resistenten Bakterien führen. Das als Stauchungsmittel entwickelte Prohexadion-Ca wird zur

vorbeugenden Bekämpfung von Sekundär- bzw. Triebspitzeninfektionen durch Beeinflussung der Flavonoidbiosynthese der Pflanze verwendet²⁶⁻²⁹. Ebenso wird Kupfersalzen ein gewisser protektiver Effekt zugeschrieben. Zur kurativen Bekämpfung von Feuerbrand stehen derzeit keine chemischen Präparate zur Verfügung, so daß bei Befallsverdacht bis heute die einzig effektive Bekämpfung für bereits infizierte Pflanzen darin besteht, die betroffenen Äste abzuschneiden und fachgerecht zu entsorgen. Aus dem Mangel an chemischen Bekämpfungsmöglichkeiten gewinnen Ansätze zur biologischen Bekämpfung von *Erwinia amylovora* mittels antagonistischer Bakterien- bzw. Pilzstämme wie etwa *Aureobasidium pullulans*, zumindest zur Reduktion von Blüteninfektionen, immer mehr an Bedeutung³⁰. *Aureobasidium pullulans* ist ein Schimmelpilz (*Deuteromycetes*) und wächst unter ungünstigen Lebensbedingungen in Form von schwarzen Sprosszellen. Diese sprossenden Entwicklungsformen werden mitunter als „Schwarze Hefen“ bezeichnet. Er kommt weltweit häufig im Boden, Kompost, Abwasser, Früchten und auf Blättern und jungen Trieben von Apfel- und Birnenbäumen vor.

Der Apfelanbau stellt in Österreich die wichtigste Obstkultur dar. Die Gesamtfläche des Kernobstintensivanbaus umfasst circa 6500 ha, davon sind mehr als 90% des Anbaus Apfelbäume. Zusätzlich wird der Streuobstbau mit 5,5 Millionen Bäumen angenommen. Aus diesem Grund stellt die Verbreitung von Feuerbrand eine ernstzunehmende Gefahr dar und kann für betroffene Apfelplantagen einen großen finanziellen Verlust bedeuten. Daher wird laufend nach neuen Präventionsstrategien gegen *Erwinia amylovora* gesucht.

Ziel der vorliegenden Studie war es den Allergengehalt in Äpfeln aus dem Freiland zu bestimmen. Dabei wurden Äpfel von Bäumen mit Feuerbrandinfektion, von Bäumen mit Feuerbrand und *A. pullulans*-Koinfektion und von nicht infizierten Bäumen untersucht. Weiters wurden im Glashaus Sämlinge gezogen, mit *E. amylovora* infiziert und ebenfalls auf den Mal d 1-Gehalt untersucht.

Mit diesen Daten soll der Einfluss einer Feuerbrandinfektion einerseits und einer Pilzinfektion als Präventionsmaßnahme andererseits auf den Allergengehalt von Früchten geprüft werden.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial wurden 2 verschiedene Apfelkultivare ausgewählt: *Malus domestica* var. *Golden Delicious* und *Malus domestica* var. *Topaz*. Es sind von einigen Apfelsorten unterschiedliche Resistenzen gegen Feuerbrand bekannt: *Golden Delicious* ist

für diese Krankheit eher wenig anfällig, Topaz hingegen ist eine sehr anfällige Sorte gegenüber diesem Bakterienbefall.

Apfelsämlinge

Pro Versuch wurden die Sämlinge (Saatgut von der Sorte Golden Delicious geerntet) 6 Monate alt, in 6 Gruppen zu je 10 Pflanzen unterteilt. Die Einteilung erfolgte in die Varianten: 1. Apfelsämlinge mit trockener Schere angeschnitten, 2. Apfelsämlinge mit in Wasser getauchter Schere angeschnitten, 3. mit Prohexadion-Ca (0.05%) behandelte Sämlinge, 4. mit Prohexadion-Ca (0.05%) behandelte und mit Wasser angeschnittene Sämlinge, 5. mit *Erwinia amylovora* 295/93 angeschnittene Sämlinge und 6. mit Prohexadion-Ca (0.05%) behandelte und mit 295/93 angeschnittene Sämlinge. Die Applikation von Prohexadion-Ca (0.05%) erfolgte 7 Tage vor dem Pflanzenanschnitt bzw. der Infektion mittels *Erwinia amylovora* 295/93. Die Bakteriensuspension wurde auf ca. 10^8 CFU/ml eingestellt (OD 0,1 bei 600nm = gemessen mit Eppendorf BioPhotometer), Stamm *Erwinia amylovora* 295/93. Die Infektion erfolgt durch Anschneiden der obersten 4 Blätter mittels Scheren, welche vorher in *Erwinia amylovora* 295/93-Suspension bzw. Wasser bei der Kontroll-Variante getaucht wurden. Die visuelle Bonitur der Feuerbrandsymptome und die Probenahme wurden am Tag 8 nach der Infektion durchgeführt. Insgesamt wurden 120 Pflanzen aufgearbeitet.

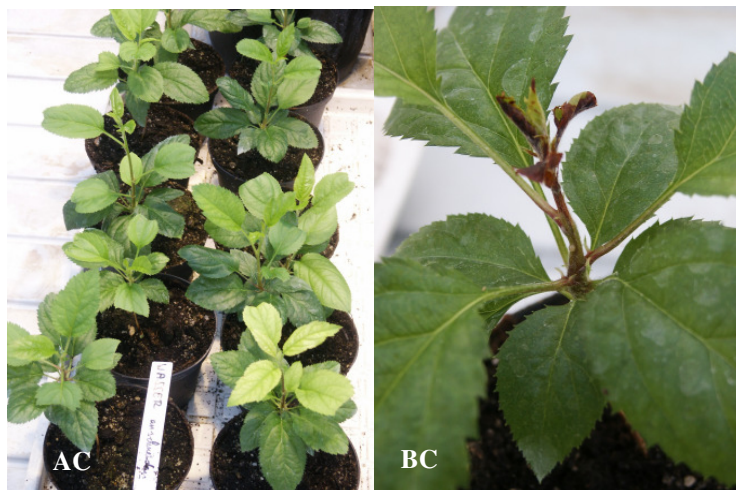




Abbildung 1. A Golden Delicious Sämlinge. Gesunde Kontrollen. B, C, D Geschwärzte Blätter verursacht durch Feuerbrandinfektion. Das Bakterium dringt in die Pflanze durch offene Schnittstellen ein und bewirkt braune, nekrotische Läsionen auf den Blättern. D Sämling mit Feuerbrand (*E. amylovora*). Der Pfeil markiert einen für Feuerbrandinfektionen typischen bakteriellen Schleimtropfen, welcher einerseits Sekundärinfektionen auf derselben Pflanze verursachen kann, andererseits höchst ansteckend für andere Apfelbäume ist.

Freilandproben

Die Äpfel wurden aus einer Obstanlage mit natürlichem Feuerbrand (*Erwinia amylovora*-Befall) gewonnen, wobei die Proben von markierten Bäumen in einer Reihe gezogen wurden um den Einfluß der Umweltbedingungen, wie z. B. Bodendüngung und Mikroklima, gleich zu halten. Die Pflanzenschutzversuche anhand des Schimmelpilzes *Aureobasidium pullulans* wurden unter Einhaltung eines genauen Zeitschemas durchgeführt. Da Äpfel mit natürlichen Feuerbrandsymptomen eher selten und hauptsächlich nach Hagel zu finden sind und daher schnell faulen, wurde in der Regel mit Äpfeln von infizierten Bäumen gearbeitet. Die Infektion durch *Erwinia amylovora* wurde mittels Bonitur, Isolierung des Schaderregers und spezifischer PCR festgestellt (AGES, Wien). Die Äpfel wurden von Bäumen entnommen, die eindeutige Feuerbrandsymptome zeigten. *Aureobasidium pullulans* wurde in der vorgeschriebenen Aufwandmenge: Komponente A 10,5kg/ha/ m² (Puffersubstanzen zur pH Reduktion der Lösung auf pH 3.5 -4.0) + Komponente B 1,5kg/ha/m²; Kronenhöhe (2.10 hoch 10 Blastosporen/g) durch vier zeitlich getrennte Spritzungen in die Blüte appliziert. Nach der Ernte wurden die Äpfel am Institut für Pathophysiologie für circa 3 Monate auf 4°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Das restliche Probenmaterial wurde zerkleinert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Herstellung von Apfelproteinextrakten

Um Mal d 1 in der Apfelsorte Topaz immunologisch nachweisen zu können, wurden Proteinextrakte hergestellt, die auf ihre Bindungsfähigkeit zu IgE aus Apfelallergikerseren getestet wurden. Zu diesem Zweck wurde von gesunden und infizierten Äpfeln je 100 g Apfelmaterial (Fruchtfleisch und Schale) in Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Apfelstücke wurden im Mixer zu einem feinen Pulver gemahlen und mit 100 ml Extraktionspuffer zu einer homogenen Lösung verarbeitet. Die Lösung wurde 2 h auf 4°C gerührt und anschließend 1 h mit 19000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und mit Biocryl (1 µl Biocryl auf 1 ml Extract, 1:1000) gefällt, gefolgt von einem 15-minütigen Zentrifugierschritt bei 16000 rpm, 4°C. Der Überstand wurde durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat (516 g/l) präzipitiert, bis eine 80%-ige Lösung entstand. Der Extrakt wurde für weitere 40 min auf 4°C gerührt und anschließend für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 8 ml 10 mM Natriumphosphatpuffer resuspendiert und im Dialyseschlauch (mit Cut off 1000) für 24 h gegen 10 mM Natriumphosphatpuffer bei 4°C dialysiert. Der fertige Apfelproteinextrakt wurde sofort für immunologische Tests weiterverwendet, da Mal d 1 ein äußerst labiles Allergen ist.

IgE-Immunblot

Die Apfelextrakte wurden durch SDS-Gelelektrophorese in ihre einzelnen Proteinkomponenten aufgetrennt. Dafür wurden 12% präparative Gele mit jeweils einem Proteinextrakt + 4x Loading Buffer geladen und mittels Strom elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Blots wurden auf ihre IgE-Bindungsfähigkeit mit Apfelallergikerseren getestet. Für diesen Zweck wurde die Nitrozellulosemembran in ungefähr 4 mm breite Streifen geschnitten und mit Goldpuffer + 2% Trockenmilch für 3 x 10 min bei Raumtemperatur geblockt, gefolgt von drei 10-minütigen Waschschritten mit Goldpuffer. Die Streifen wurden mit einem Patientenserumpool von Apfelallergikern (1:5 verdünnt in Goldpuffer mit 0,5% BSA) über Nacht bei leichtem Schaukeln auf 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde je ein Blotstreifen mit Serum eines Nichtallergikers (NHS) und ein Streifen nur mit Goldpuffer mitgetestet. Am darauf folgenden Tag wurden die Seren abgehoben und die Blotstreifen 3 x 10 min mit Goldpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Streifen über Nacht mit radioaktivem I¹²⁵ markiertem anti-humanen IgE inkubiert (1:40 verdünnt in Goldpuffer mit 0,5% BSA, Med Pro, Österreich). Nachdem das anti-humane IgE abgehoben wurde, folgten vier Waschschrritte mit Goldpuffer. Die trockenen Membranstreifen wurden auf einem Papier befestigt und mit einem Röntgenfilm

(Kodak BioMax MS) in einer photographischen Entwicklungskassette plaziert. Die Exposition des Films fand für 72 h auf

-70°C statt.

IgE-ELISA

Die ELISA-Platten (MaxiSorp Immuno Plate, Nalge Nunc International) wurden mit 100 µl Proteinextrakt pro Vertiefung beschichtet (10µg/ml, Verdünnungen mit 25 mM NaHCO₃, pH 9,5) und über Nacht auf 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST wurden anschließend unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl TBST + 3% Milchpulver geblockt und die ELISA-Platte für 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem die Platte entleert und drei Mal mit TBST gewaschen worden war, wurden Patientenseren von Apfelallergikern (100 µl; 1:5 verdünnt in TBST+0.5% BSA) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Bindung von IgE wurde durch Zugabe von 100 µl α-humanen monoklonalen IgE Antikörpern (AP-konjugiert, 1:1000 in TBST+0.5% BSA; BD Biosciences Pharmingen, USA) und darauffolgender zweistündiger Inkubation bei RT nachgewiesen. Anschließend folgten vier Waschschrritte mit TBST. Die Farbreaktion wurde mittels p-Nitrophenylphosphate Tabletten (Sigma fast p-Nitrophenylphosphate Tablete Sets; 100 µl/Vertiefung; Sigma, USA) detektiert und im ELISA-Reader bei 405 nm analysiert.

RNA-Isolierung aus Sämlingen

Von jeder Probe (infizierter/nicht-infizierter Sämling) wurden 20 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser mit 1 ml Tri-Reagenz (Sigma, USA) zu einer homogenen Lösung zerrieben und verarbeitet. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde für 20 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand mit 500 µl Isopropanol gemischt. Nach 10 min Inkubation wurde die Probe für 15 min mit 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde mit 50 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und auf -70°C gelagert.

Real Time PCR

Real Time PCR wurde zur relativen Quantifizierung von Mal d 1 durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2 µg RNA der Sämlinge mit Random Hexamer Primer (Fermentas, Deutschland)

mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA überführt. 15 µl Reaktionsmischung/well, bestehend aus 10 µl Mastermix, 1 µl fluoreszenz-markierte Sonde (Applied Biosystems, USA) und 4 µl H₂O, wurden auf eine Reaktionsplatte (Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, USA) aufgetragen. Die cDNA wurde mehrfach verdünnt (100 ng/µl, 50 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl, 1 ng/µl and 0.5 ng/µl), von jeder Konzentration wurden 5 µl in doppelter Ausführung zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Als interne Kontrolle wurde 18 S rRNA (Applied Biosystems, USA) verwendet. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand eines ABI PRISM 7700 Real Time PCR cycler (Applied Biosystems, USA).

Ergebnisse

Die Proteinextrakte der Äpfel wurden durch IgE-Immunblot und IgE-ELISA analysiert um den jeweiligen individuellen Mal d 1-Gehalt evaluieren zu können. Für den immunologischen Nachweis des Apfelallergens wurde ein Serumpool von Apfelallergikern verwendet.

Zuerst wurde die IgE-Bindung des Serumpools zu Mal d 1 in den Varianten Topaz mit und ohne *Erwinia amylovora*-Infektion im Immunblot getestet. Dabei wurden jeweils Banden bei 18 kDa detektiert, welches Mal d 1 entspricht. In Abbildung 3 ist ersichtlich, dass zwischen den Extrakten von Feuerbrand infizierten und gesunden Äpfeln kein qualitativer Unterschied in der IgE-Bindungsfähigkeit zu bemerken ist. Als Negativkontrollen wurden normales Humanserum (NHS) und eine Pufferkontrolle mitgetestet.

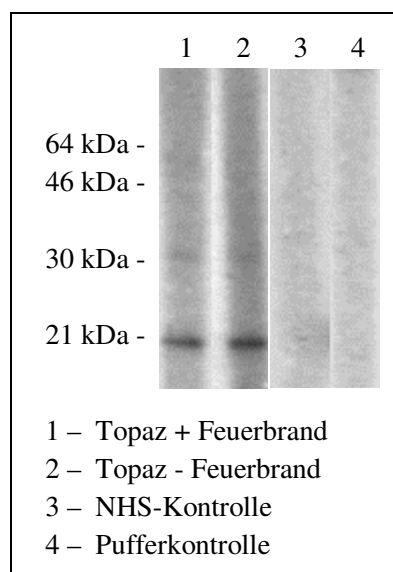


Abbildung 2: IgE-Immunblot mit Apfelproteinextrakten

Im IgE-ELISA zeigte sich, dass der Mal d 1-Gehalt (in % zum Gesamtproteingehalt) der Apfelsorte Topaz stark variiert und bei einer Feuerbrandinfektion um das 7-fache erhöht ist. Bei einer Koinfektion der Pflanze durch *Erwinia amylovora* und *Aureobasidium pullulans* ist der Mal d 1 Gehalt um das 4,4-fache gegenüber Äpfeln von nicht-infizierten Bäumen erhöht, aber trotzdem deutlich geringer als bei einer einfachen Feuerbrandinfektion (Abbildung 4).

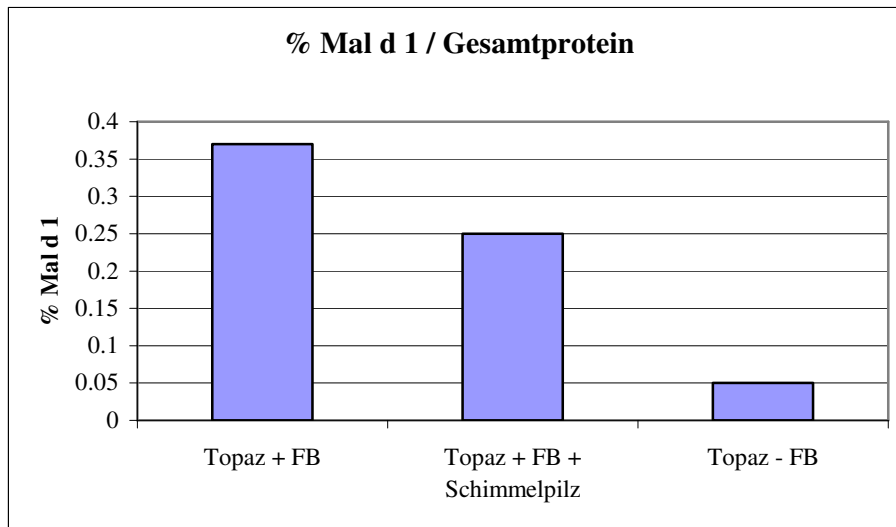


Abbildung 3. IgE-ELISA

Tabelle 1. Probenmaterial der Sämlinge (Golden Delicious)

Behandlungsform	Bonitur	Pflanzenhöhe
unbehandelt	0	20,5
angeschnitten + H ₂ O	0	15,2
Prohexadion-Ca	0	11,5
Prohexadion-Ca + angeschnitten + H ₂ O	0	12,2
angeschnitten + <i>E. amylovora</i> 295/93	3	10,3
Prohexadion-Ca + angeschn. + <i>E. amylovora</i> 295/93	1.7	10,5

Visuelle Bonitur der Feuerbrand-Symptome (Durchschnittswert von 10 Pflanzen pro Versuchsvariante und Versuchsansatz)

Boniturschlüssel:

- 0 ohne Symptome
- 1 Verbräunung des Blattgewebes nahe der Schnittstelle und der Blattader
- 2 Verbräunung von 2-3 weiteren Blättern und der Triebspitze
- 3 Verbräunung der halben Pflanze und Neuaustrieb
- 3,5 Verbräunung der halben Pflanze ohne Neuaustrieb
- 4 Verbräunung des gesamten Triebes, Pflanze tot

In Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Behandlung der Sämlinge mit dem Stauchungsmittel Prohexadion-Ca eindeutig die Pflanzenhöhe und die Schwere der Feuerbrand-Symptomatik reduzierte. Ebenfalls führte eine Infektion durch *Erwinia amylovora* zu einem Wachstumsrückgang der Sämlinge.

Die relative Quantifizierung von Mal d 1 in den Sämlingen wurde mittels Real Time PCR durchgeführt. Dazu wurde cDNA aus infizierten und nicht-infizierten Blättern der Sorte Golden Delicious verwendet, um den Einfluß einer Feuerbrandinfektion auf den Mal d 1-Gehalt in den Sämlingen zu testen. Der quantitative Nachweis von Mal d 1 zeigte eindeutig, dass Feuerbrand den Allergengehalt hochregulierte (Abbildung 5.). Da Mal d 1 in den Blättern quantitativ generell sehr gering nachzuweisen war, konnte der Einfluß einer Behandlung mit Prohexadion-Ca auf den Allergengehalt nicht bestimmt werden.

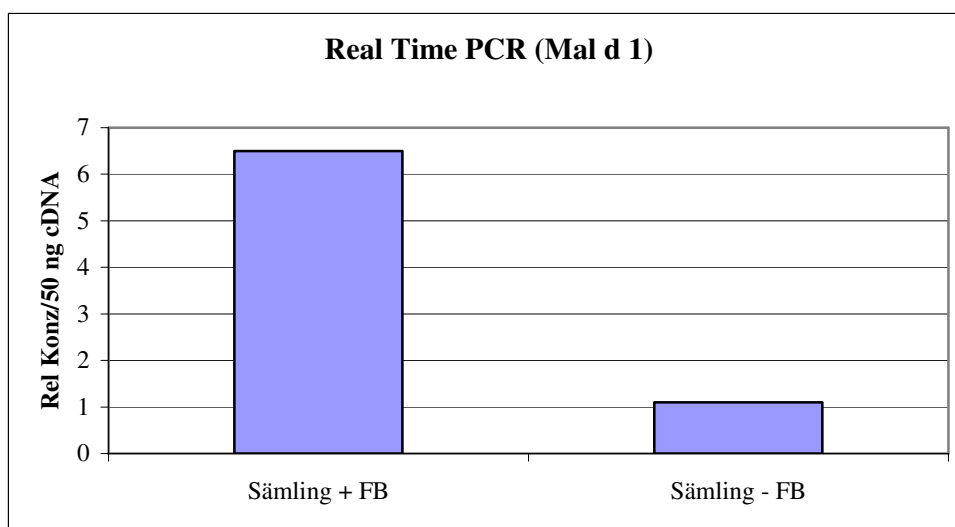


Abbildung 4. Real Time PCR zur relativen Quantifizierung von Mal d 1 in Apfelsämlingen.

Zusammenfassung und Diskussion

Anhand von *in vitro* und Skin Prick Tests wurde gezeigt, dass sich Apfelsorten in ihrer Allergenizität unterscheiden, wobei eine Einteilung in hoch-allergene (Golden Delicious), mittel- (Elstar) und niedrig-allergene Äpfel (Topaz) möglich ist^{31,32}.

Die Induktion von Mal d 1 in Sämlingen durch Pathogenbefall wurde bereits durch *in vitro*-Versuche bestätigt³³. In der aktuellen Studie wurde zum ersten Mal der Einfluß einer Feuerbrandinfektion auf Äpfel und Sämlinge im Freiland untersucht.

Mittels IgE-Immunoblot und ELISA konnte Mal d 1 in den Äpfeln der Sorte Topaz nachgewiesen und die IgE-Bindungsfähigkeit zu Seren von Apfelallergikern gezeigt werden. Äpfel von *E. amylovora* infizierten Bäumen zeigten durchwegs höhere Mal d 1-Werte als Früchte von nicht-infizierten Bäumen. Eine zusätzliche Behandlung mit dem Schimmelpilz *Aureobasidium pullulans* reduzierte den Mal d 1-Gehalt in den Apfelproben. Trotzdem war der Allergengehalt in diesen Früchten höher im Vergleich zu Proben von gesunden Bäumen.

Zusammenfassend kann man anhand dieser Untersuchungen schließen, daß sowohl eine Infektion mit *Erwinia amylovora* als auch die Schutzbehandlung mit *Aureobasidium pullulans* einen Pathogenbefall darstellt, der in der Pflanze den Proteingehalt von Mal d 1 hochreguliert. Dieser Effekt ist bei einer Koinfektion zwar niedriger als bei einer einfachen Infektion durch *E. amylovora*, aber noch immer deutlich erhöht verglichen zu Proben von nicht infizierten Bäumen.

Da Mal d 1 allergen wirksam ist, stellt sich die Frage, ob sich mit einer Infektion von *Erwinia amylovora* und der Bekämpfungsmaßnahme mittels des Schimmelpilzes *Aureobasidium pullulans* auch das Allergierisiko beim Verzehr solcher Äpfel erhöht. Da die Mal d 1-Konzentration primär stark sortenabhängig ist und der erhobene Allergengehalt für den niedrig-allergenen Apfel Topaz, selbst nach einer Infektion durch Feuerbrand oder Schimmelpilz, noch immer deutlich unter den Werten anderer Apfelsorten von nicht infizierten Bäumen liegt, ist nach heutigem Wissensstand nicht mit einem erhöhten Allergierisiko zu rechnen.

Danksagung

Herrn Ing. G. Bechter, vormals Landwirtschaftskammer Vorarlberg, Herrn DI U. Höfert, Landwirtschaftskammer Vorarlberg und Herrn H. Turner, Landwirtschaftskammer Tirol sei für die wertvolle Unterstützung bei der Anlagenauswahl und den Probenahmen gedankt sowie Herrn J. Schaffer, AGES, für die perfekte Versuchsdurchführung an den Kulturen unter Glas.

Das vorliegende Projekt (Nr. 1383) wurde vom österreichischen Lebensministerium gefördert.

References:

1. Kerkhof M, Droste JH, de Monchy JG, Schouten JP, Rijcken B. Distribution of total serum IgE and specific IgE to common aeroallergens by sex and age, and their relationship to each other in a random sample of the Dutch general population aged 20-70 years. Dutch ECRHS Group, European Community Respiratory Health Study. *Allergy* 1996;51:770-6.
2. Vieths S, Schoning B, Petersen A. Characterization of the 18-kDa apple allergen by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:399-404.
3. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, et al. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:538-51.
4. Hsieh LS, Moos M, Jr., Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kDa allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:960-70.
5. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Ispano M, Fortunato D, Monza M, et al. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1099-106.
6. van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:97-104.
7. van Ree R, Fernandez-Rivas M, Cuevas M, van Wijngaarden M, Aalberse RC. Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:726-34.
8. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:962-
9. Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983;38:167-72.
10. Eriksson NE. Food sensitivity reported by patients with asthma and hay fever. A relationship between food sensitivity and birch pollen-allergy and between food sensitivity and acetylsalicylic acid intolerance. *Allergy* 1978;33:189-96.
11. Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:728-33.
12. van Loon LC, van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Phys Mol Plant Pathol* 1999;55:85-7.
13. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:821-30; quiz 31.
14. Hoffmann-Sommergruber K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:155-66.
15. Somssich IE, Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding 'pathogenesis-related' proteins in cultural parsley cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2427-30.
16. Walter MH, Liu JW, Grand C, Lamb CJ, Hess D. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. *Mol Gen Genet* 1990;222:353-60.
17. Matton DP, Brisson N. Cloning, expression, and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Mol Plant Microbe Interact* 1989;2:325-31.
18. Warner SA, Scott R, Draper J. Characterisation of a wound-induced transcript from the monocot asparagus that shares similarity with a class of intracellular pathogenesis-related (PR) proteins. *Plant Mol Biol* 1992;19:555-61.

19. Walter MH, Liu JW, Wunn J, Hess D. Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur J Biochem* 1996;239:281-93.
20. Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, et al. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 1993;75:687-706.
21. Van der Zwet T, Keil, HL. Fire Blight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department Agriculture Handbook, Washington DC 1979;510.
22. Bonn W, van der Zwet, T. Distribution and economic importance of fire blight. J Vanneste (ed), Fire blight, the disease and its causative agent *Erwinia amylovora* 2000:37-54.
23. Jock S, Donat, V, Lopez, MM, Bazzi, C, Geider, K. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ Microbiol* 2002;4:106-14.
24. Keck M, Chartier R., Lecomte P., Reich H., Paulin J.P. First characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Austria and fire blight susceptibility of some apple genotypes from Central Europe. *J Plant Dis Protect* 1997;66:4897-907.
25. Keck M. Ten years of experience with fireblight in Austria. *OEPP/EPPO Bulletin* 2004;34:347-9.
26. Rademacher W, Temple-Smith, K.E., Griggs, D., Hedden, P. The mode of action of acylcyclohexanediones - a new type of growth retardant. 1992:571-7.
27. Fernando W, Jones, AL. Prohexadione calcium - a tool for reducing secondary fire blight infection. *Acta Hort (ISHS)* 1999;489:597-600.
28. Rademacher W. Prohexadione-Ca induces resistance to fireblight and other diseases. *OEPP/EPPO Bulletin* 2004;34:383-8.
29. Roemmelt S, Zimmermann, N., Rademacher, W., Treutter, D. Formation of novel flavanoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochem* 2003;64:709-16.
30. Lima G, Ippolito, A., Nigro, F., Salerno, M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rot. *Postharvest Biol Technol* 1997;10:169-78.
31. Vieths S, Jankiewicz A, Schoning B, Aulepp H. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy* 1994;49:262-71.
32. Bolhaar ST, van de Weg WE, van Ree R, Gonzalez-Mancebo E, Zuidmeer L, Buijnzeel-Koomen CA, et al. In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1080-6.
33. Puehringer H, Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H., Laimer da Camara Machado, M. The promoter of an apple *Ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science* 2000;152:35-50.

Autoren:

Mayer M., Oberhuber C., Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K.

Medizinische Universität Wien

Zentrum für Physiologie and Pathophysiologie, Institut für Pathophysiologie

Keck M.,

Lebensministerium, Wien

Loncaric I., Heissenberger B., Keck M.,

AGES, Wien

Kontakt:

Univ. Doz. Dr. Karin Hoffmann-Sommergruber

AKH Wien

Institut für Pathophysiologie, EBO 3Q

Währinger Gürtel 18-20

A-1090 Wien

Tel: +43-1-40400/5116

Fax: +43-1-40400/5130