

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 1076/2011
(22) Anmeldetag: 22.07.2011
(43) Veröffentlicht am: 15.02.2013

(51) Int. Cl. : **G01N 1/00** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(56) SABATINI, A.G., ALEXANDROVA, M.,
CARPANA, E., MEDRZYCKI, P.,
BORTOLOTTI, L., GHINI, S., GIROTTI, S.,
PORRINI, C., BAZZI, C., BARONI, F. AND
ALESSANDRINI, A. 2006. RELATIONSHIPS
BETWEEN APIS MELLIFERA AND ERWINIA
AMYLOVORA: BIOINDICATION, BACTERIUM
DISPERSAL AND QUARANTINE
PROCEDURES. ACTA HORT. (ISHS)
704:155162
ALEXANDROVA, M., CIMINI, B., BAZZI, C.,
CARPANA, E., MASSI, S. AND SABATINI, A.G.
2002. THE ROLE OF HONEYBEES IN
SPREADING ERWINIA AMYLOVORA. ACTA
HORT. (ISHS) 590:5560

(73) Patentanmelder:
TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
1040 WIEN (AT)
(72) Erfinder:
Stich Karl Dr.
GERASDORF (AT)
Fischer Thilo Dr.
BURGSCHLEINITZ-KÜHNRING (AT)
Gosch Christian Dr.
ST. ULRICH IM GREITH (AT)

(54) **VERWENDUNG EINER BIENENPOPULATION ZUR GEWINNUNG VON PROBEN VON PFLANZEN**

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, wobei die Probengewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Eingang zu ihrer Behausung erfolgt, mit dem Kennzeichen, dass als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt, und dass die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, wobei die Proben-gewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Ein-gang zu ihrer Behausung erfolgt, mit dem Kennzeichen, dass als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt, und dass die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe ist.



Die Erfindung betrifft die Verwendung einer bestimmten Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden.

Es ist bekannt, Bienen am Eingang zum Bienenstock eine Laufstrecke, wie z.B. ein Lochgitter, einen Kamm oder eine Folie, passieren zu lassen, um zu verschiedenen Zwecken Proben der von diesen angeflogenen Blüten, z.B. Nektar- oder Pollenproben, zu gewinnen, die am Lochgitter oder Kamm abgestreift werden und in einen darunter montierten Auffangbehälter fallen oder DNA-Reste an den Tarsen, die an einer Folie haften bleiben.

Um in kurzer Zeit ausreichend große Probenmengen zu erhalten, wird standardmäßig die Honigbiene als Bienenvolk für die Probennahme gewählt, die Staaten aus bis zu 80.000 Individuen bildet.

Nachteilig ist hierbei jedoch die Tatsache, dass so große Bienenpopulationen riesige Gebiete abfliegen und dabei Pollen und Nektar zahlreicher unterschiedlicher Pflanzenarten sammeln. Die Analyse von Pollen einer spezifischen Pflanzenart ist dadurch nahezu unmöglich, zumindest aber mit einem enormen Aufwand verbunden.

Weiters ist bekannt, Wildbienenstämme zur Bestäubung von Pflanzen in einem definierten, begrenzten Areal, z.B. einer Obstplantage, einzusetzen. Wildbienen bilden, wenn überhaupt, weitaus kleinere Staaten aus wenigen tausend oder auch nur hundert Individuen, deren Fluggebiet in der Regel sehr eingeschränkt ist. Somit eignen sie sich nur bedingt zur Probennahme, da in einem bestimmten Zeitraum nur sehr geringe Probenmengen gewonnen werden könnten.

Andererseits besteht ein dringendes Interesse daran, möglichst früh über den eventuellen Befall einer Pflanzenart mit einem Erreger Bescheid zu wissen, um Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. So ist etwa der Befall von Obstpflanzen mit dem Feuerbranderreger ein stetiges Problem in der Landwirtschaft. Feuerbrand wird vom gram-negativen Bakterium *Erwinia amylovora* hervorgerufen, das Pflanzen der Familie der Rosaceen befällt, besonders Gattungen der Unterfamilie Maloideae (Kern-

obstgehölze), vor allem Apfel (*Malus x domestica*), Birne (*Pyrus communis*) und Quitte (*Cydonia oblonga*). Die Infektion erfolgt in der Regel über die Blüte (primärer Feuerbrand). Im Gegensatz dazu werden Infektionen über das Laub, später in der Vegetationsperiode, als sekundärer Feuerbrand bezeichnet. Die Infektion der Blüte breitet sich über das Xylem aus und führt zu einer im Holz fortschreitenden Nekrose. Die Krankheit verursacht verheerende Schäden in Obstanlagen mit entsprechenden wirtschaftlichen Verlusten.

Die Apfel- und Birnenblüte beginnt in Mitteleuropa üblicherweise im April, in wärmeren Regionen mitunter schon Ende März. Die zu dieser Zeit herrschenden Durchschnittstemperaturen sind für Honigbienen jedoch an vielen Tagen zu niedrig, um normales Flugverhalten zu zeigen.

Ziel der Erfindung war vor diesem Hintergrund die Entwicklung einer Methode, wie zu einem möglichst frühen Zeitpunkt im Jahr ausreichende Informationen über einen potenziellen Befall von Nutzpflanzen mit bestimmten Erregern erhalten werden können.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Dieses Ziel erreichen die Erfinder in einem ersten Aspekt durch die Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, wobei die Probengewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Eingang zu ihrer Behausung erfolgt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die
 - i) normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und
 - ii) deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt; und
- b) die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe ist.

Auf diese Weise ist gewährleistet, dass von den Bienen ein relativ begrenztes Gebiet abgeflogen wird und dabei Pollen und Nektar von nur wenigen Pflanzenarten gesammelt werden, wodurch die DNA-Probe einen relativ geringen Verdünnungs- bzw. Kontaminationsgrad aufweist, und dass die Analyse zu einem frühen Zeitpunkt, idea-

lerweise unmittelbar nach dem Beginn der Blüte des jeweiligen Pflanzenart, durchgeführt werden kann. Eine solch kleine Bienenpopulation ist darüber hinaus wesentlich einfacher handzuhaben und zu transportieren.

Die eingangs erwähnte Tatsache, dass von so kleinen Bienenpopulationen in einem bestimmten Zeitraum nur sehr geringe Probenmengen gewonnen werden können, stellt für die Erfinder keine Einschränkung dar, da sie vor kurzem, nämlich in der österreichischen Patentanmeldung A 640/2011, ein Verfahren zum Nachweisen von *Erwinia amylovora* in einer Probe unter Anwendung der LAMP-Methode beschrieben, haben das unter Verwendung einer genomischen Sequenz des Feuerbranderreger als Referenzsequenz und eines darauf basierenden, hochspezifischen Primersatzes zur Amplifikation der *Erwinia amylovora*-DNA durchgeführt wird. Mittels dieses Verfahrens konnten sogar Probenmengen von nur 80 bis 100 fg an *Erwinia amylovora*-DNA zuverlässig und reproduzierbar nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde der Primersatz von den Erfindern aufwändig optimiert, um Artefakte aufgrund von kontaminierender DNA möglichst auszuschließen.

Die in der AT A 640/2011 offenbarten Primer sind die folgenden:

Bez.	Primer-Typ	Sequenz (5'-3' Orientierung)
15-F3	forward outer	CTTTTTTAAGAGAGGCAGCA
15-B3	backward outer	TTGTCTGAATCCAGATGTCT
15-FIP	forward inner	GGAGACCGATCTTTACAGACTTTATTTCGACGAACGTTTATACGA
15-BIP	backward inner	GAGCTTCGAACATAGTCAAGGGGAAGATTTATGCCTTCCAGAAG
15-LF	loop forward	CAGAACTTACCATATAATCA
15-LB	loop backward	ACGGCGCAAAAAAT

Daher kann eine gemäß vorliegender Erfindung ausgewählte Bienenart auch Populationen aus nicht mehr als 500 oder sogar unter 100 Individuen bilden, ohne dass die Gefahr besteht, dass keine ausreichenden DNA-Mengen gesammelt werden können.

Abgesehen von der Größe der Population und ihrer Flugzeit ab April oder früher sind die Bienenarten nicht speziell eingeschränkt. Unter Population ist hierin im weitesten



Sinne jede Art von Bienengemeinschaft in einem begrenzten Areal zu verstehen, also sowohl entsprechend kleine "Staaten" oder Kolonien in einem Bienenstock oder einem unterirdischen Nest als auch eine entsprechende Anzahl an Bienen auf einer bestimmten Bodenfläche, z.B. von einigen Quadratmetern. Theoretisch kommen daher auch Solitärbienen für die vorliegende Erfindung in Frage, d.h. Bienen, die jeweils alleine in unterirdischen Nestern oder Mauerspalten leben und dort ihre Nachkommen aufziehen, solange eine größere Anzahl von ihnen pro Quadratmeter anzutreffen ist. Es muss lediglich vor jedem Eingang zu ihren Behausungen eine entsprechende Laufstrecke, z.B. eine Folie, vorgesehen werden, und am Ende der Probennahme werden die mittels aller Laufstrecken gesammelten Proben einfach kombiniert.

Vorzugsweise werden jedoch soziale Bienenarten verwendet, die eine gemeinsame Behausung, d.h. in einem Stock oder Nest, nutzen, um die Anzahl an erforderlichen Laufstrecken gering zu halten und dennoch in kurzer Zeit die notwendige Probenmenge sammeln zu können. Gemäß der Erfindung können den Bienen auch Nisthilfen zur Verfügung gestellt werden, d.h. vorgefertigte Stöcke oder Nester, wobei unter Letzteren auch eine größere Anzahl an Niströhren für Solitärbienen auf einer Fläche von wenigen Quadratmetern zu versehen ist.

Der Fachmann wird ohne übermäßiges Experimentieren in der Lage sein, die für den jeweiligen Zweck am besten geeigneten Bienenarten auszuwählen, wobei vor allem die geografische Lage, das dortige Klima, die Bodenbeschaffenheit und natürlich die zu bestäubende und zu untersuchende Pflanzenart zu berücksichtigen ist. Vorzugsweise ist die Bienenart aus den Gattungen Hummel, Sandbiene und Mauerbiene ausgewählt, wobei noch bevorzugter eine Hummelart eingesetzt wird. Deren Flugzeit beginnt typischerweise im März, bei manchen Sandbienenarten sogar schon im Februar, und Hummeln sind besonders früh im Jahr unterwegs, wie nachstehend noch ausführlicher erläutert wird.

Von den zahlreichen Hummel-, Sandbienen- und Mauerbienenarten – in Mitteleuropa kommen etwa 40 Hummel-, 150 Sandbienen- und etwa 50 Mauerbienenarten vor –



sind die meisten Solitärbiene. Allerdings ist auch eine soziale Lebensweise, d.h. ein gemeinsames Nest, mancher der eigentlich als Solitärbiene bekannten Bienenarten bekannt. Wird daher in einem bestimmten Gebiet, wie z.B. einer Obstplantage, ein Nest mit einer Laufstrecke am Nesteingang als Nisthilfe bereitgestellt, kann es von einer dort gezielt ausgesetzten Bienenart gemeinsam genutzt werden.

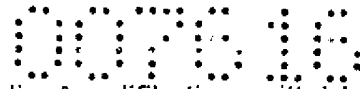
Verschiedene Hummelarten bilden allerdings auch Kolonien oder Staaten aus etwa 50 bis 600, mitunter bis zu 1.000 Tieren und einer Königin. Für Hummeln reicht bereits eine Mindesttemperatur von nur 6-9 °C aus, um ausfliegen zu können (bei Königinnen sogar nur 2 °C), da sie ein dichtes Haarkleid besitzen, vor allem aber ihre Körpertemperatur durch Vibrationen der Brustmuskulatur, wobei die Flügel abgekoppelt werden, selbst erhöhen können. Diese Fähigkeit ist unter den verschiedenen Bienenengattungen einzigartig. Zum Vergleich benötigen Honigbienen üblicherweise 10-15 °C. Darüber hinaus sind Hummeln weitaus effizientere Bestäuber und damit Probensammler als andere Bienenengattungen, insbesondere als die Honigbiene. So produziert beispielsweise ein Hummelstaat bis zu 15-mal so viel Honig wie ein gleich großer Staat der Honigbiene.

Die zu gewinnende DNA ist vorzugsweise Schädling-DNA, insbesondere *Erwinia amylovora*-DNA, die dann beispielsweise nach dem in der AT A 640/2011 offenbarten Verfahren amplifiziert und analysiert werden kann.

Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung in einem zweiten Aspekt ein Set zur Verwendung gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung bereit, das Folgendes umfasst:

- a) eine transportsicher verpackte Bienenpopulation wie oben beschrieben und
- b) Mittel zum Analysieren der in der zu gewinnenden Probe enthaltenen DNA.

Mittels eines solchen Sets können die gemäß vorliegender Erfindung gewonnenen DNA-Proben vor Ort, also z.B. direkt in einer Obstplantage, analysiert werden. Die Analysenmittel umfassen dabei vorzugsweise Mittel zum Amplifizieren der DNA mittels PCR- oder LAMP-Verfahren, wodurch – beispielsweise im Vergleich mit ELISA-Methoden – auch sehr geringe Probenmengen ausreichen, um die DNA zuverlässig

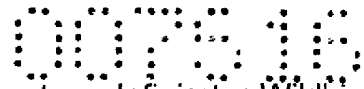


analysieren zu können. Noch bevorzugter umfassen die Amplifikationsmittel Instrumente zur Durchführung eines LAMP-Verfahrens, da LAMP ("*loop-mediated isothermal amplification*") im Vergleich mit PCR- ("*polymerase chain reaction*") Amplifikation keine Thermocycler erfordern.

Die Analysenmittel des Sets umfassen daher vorzugsweise weiters spezifische Primer für die LAMP-Reaktion, sowie gegebenenfalls eine Heizvorrichtung und/oder Mittel zur Visualisierung von Produkten oder Nebenprodukten der Amplifikation, wobei ein bevorzugtes Visualisierungsmittel der Farbindikator Hydroxynaphtholblau ist. Auf diese Weise können mit dem erfindungsgemäßen Set beispielsweise Analysen nach dem in der AT A 640/2011 offenbarten Verfahren der Erfinder durchgeführt werden.

Die optionale Heizvorrichtung braucht dabei vorzugsweise nur eine Temperatur von 60-65 °C zu erzeugen, da dies für LAMP-Verfahren durchaus ausreicht und einen mobilen Einsatz im Feld weiter vereinfacht: Für diese Temperaturen reicht beispielsweise auch Heißwasser in einer Thermoskanne aus, die somit ebenfalls unter die Definition der Heizvorrichtung fällt. Alternativ dazu können etwa batteriebetriebene Widerstandsheizungen, als so genannte "Taschenwärmer" bekannte Systeme, die beispielsweise auf der Oxidation von auf einem Träger (z.B. Watte) fein verteiltem Eisenpulver oder auf frei werdender Kristallisationswärme nach mechanischer Auslösung beruhen, oder auch Parabolspiegel zur Bündelung von Sonnenstrahlen eingesetzt werden.

Hydroxynaphtholblau ist als Visualisierungsmittel bevorzugt, da in Gegenwart von Erdalkalimetallionen ein Farbumschlag von violett nach blau stattfindet, der mit bloßem Auge gut zu erkennen ist. Die Erdalkalimetallionen stammen beispielsweise von einem Magnesiumpyrophosphat-Niederschlag, der als Nebenprodukt der LAMP-Reaktion anfällt und eine Trübung verursacht, die als solche ebenfalls zur Visualisierung herangezogen werden könnte. Der Farbumschlag ist jedoch schon bei geringeren Mengen an Amplifikationsprodukten gut sichtbar und daher bevorzugt.



Durch die erfindungsgemäße Verwendung bestimmter, oben definierter Wildbienenarten, einschließlich der Gattung Hummel, zur DNA-Probengewinnung von Pflanzen, insbesondere von Nutzpflanzen wie Obst- und Gemüsepflanzen, können Informationen über den Befall der jeweilige Pflanze mit einem Erreger bereits kurz nach Beginn der Blütezeit erlangt werden, was mehr Zeit für eventuell erforderliche Gegenmaßnahmen zur Verfügung stellt. Vor allem bei Einsatz des Sets gemäß dem zweiten Aspekt der Erfindung, insbesondere in Kombination mit dem oben beschriebenen Primersatz, können auf zuverlässige Weise Informationen über die von den Bienen bestäubten Pflanzen erhalten werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung einer Bienenpopulation zur Gewinnung von Proben von Pflanzen, die von diesen Bienen bestäubt werden, wobei die Probengewinnung mittels einer von den Bienen zu betretenden Laufstrecke vor dem Eingang zu ihrer Behausung erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, dass

- a) als Bienenpopulation eine oder mehrere Bienenarten eingesetzt werden, die
 - i) normalerweise Populationen aus nicht mehr als 1.000 Individuen bilden und
 - ii) deren jährliche Flugzeit im April oder früher beginnt; und
- b) die zu gewinnende Probe eine DNA-Probe ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bienenart Populationen aus nicht mehr als 500 Individuen bildet.

3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bienenart Populationen aus nicht mehr als 100 Individuen bildet.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Flugzeit der Bienenart bereits im März oder früher beginnt.

5. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere aus den Gattungen Hummel, Sandbiene und Mauerbiene ausgewählte Bienenart eingesetzt wird.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Hummelarten eingesetzt werden.

7. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zu gewinnende DNA-Probe eine Schädlings-DNA ist.

007615

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zu gewinnende DNA-Probe *Erwinia amylovora*-DNA ist.
9. Set zur Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, Folgendes umfassend:
- a) eine transportsicher verpackte Bienenpopulation wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert und
 - b) Mittel zum Analysieren der in der zu gewinnenden Probe enthaltenen DNA.
10. Set nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel Mittel zum Amplifizieren der DNA mittels PCR- oder LAMP-Verfahren umfassen.
11. Set nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationsmittel Instrumente zur Durchführung eines LAMP-Verfahrens umfassen.
12. Set nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel weiters spezifische Primer für die LAMP-Amplifikation umfassen.
13. Set nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel eine Heizvorrichtung umfassen.
14. Set nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Analysenmittel weiters Mittel zur Visualisierung von Produkten oder Nebenprodukten der Amplifikation umfassen.
15. Set nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein Visualisierungsmittel der Farbindikator Hydroxynaphtholblau ist.

Wien, am 22. Juli 2011

Technische Universität Wien
durch:

Häupl & Ellmeyer KG

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC: G01N 1/00 (2006.01); C12Q 1/68 (2006.01); G01N 33/00 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: G01N 1/00; C12Q 1/68M10B; G01N 33/00V		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): G01N		
Konsultierte Online-Datenbank: Wpi, Epodoc, Pubmed, Medline, Embase		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 22. Juli 2011 eingereichten Ansprüchen 1-9 erstellt.		
Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	SABATINI, A.G., ALEXANDROVA, M., CARPANA, E., MEDRZYCKI, P., BORTOLOTTI, L., GHINI, S., GIROTTI, S., PORRINI, C., BAZZI, C., BARONI, F. AND ALESSANDRINI, A. 2006. RELATIONSHIPS BETWEEN APIS MELLIFERA AND ERWINIA AMYLOVORA: BIOINDICATION, BACTERIUM DISPERSAL AND QUARANTINE PROCEDURES. ACTA HORT. (ISHS) 704:155162 *Ganzes Dokument*	1-9
X	ALEXANDROVA, M., CIMINI, B., BAZZI, C., CARPANA, E., MASSI, S. AND SABATINI, A.G. 2002. THE ROLE OF HONEYBEES IN SPREADING ERWINIA AMYLOVORA. ACTA HORT. (ISHS) 590:5560 *Ganzes Dokument*	1-9
Datum der Beendigung der Recherche: 7. März 2012		☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): GÖRNER W.
¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		