
Diagnose- und Nachweisverfahren

123 - Etablierung eines molekularen on-site Testverfahrens zur Diagnose von Phytoplasmen an Reben und Obstkulturen

Development of an on-site molecular diagnostic tool for phytoplasmas in grapevine and other specialty crops

Holger Linck¹, Sven Keil², Frank Brändle², Annette Reineke¹

¹Hochschule Geisenheim

²IDENTXX GmbH

Phytoplasmen (*Candidatus Phytoplasma*) sind zellwandlose phytopathogene Bakterien, die als obligate Parasiten im Phloem ihrer Wirtspflanzen leben, über 700 Pflanzenarten befallen können und zu erheblichen Ernteverlusten führen können. In Reben (*Vitis vinifera*) sind Phytoplasmen für die Schwarzholzkrankheit (Bois noir) und die Goldgelbe Vergilbung (Flavescence dorée) verantwortlich. In den ökonomisch wichtigen Kernobstarten Apfel (*Malus domestica*) verursachen Phytoplasmen die Apfeltriebsucht, und in Birne (*Pyrus*) führen sie zum Birnenverfall. Übertragen werden sie von phloemsaugenden Vektorinsekten, die häufig wärmeliebend sind und sich daher im Rahmen der Klimaerwärmung weiter verbreiten. Managementstrategien für diese Phytoplasmosen stützten sich im Moment allein auf einer Eindämmung der Verbreitung durch Bekämpfung der Vektorinsekten und der Verwendung von befallsfreiem Pflanzgut. Die Identifikation befallsfreier Pflanzen anhand möglicher Phytoplasmen-Symptome wird allerdings durch eine lange Inkubationszeit infizierter Pflanzen erschwert. Daher ist die Verfügbarkeit eines einfachen und schnellen molekularen on-site Nachweises, der von Vermehrungsbetrieben, Beratern oder Pflanzenschutzdiensten direkt vor Ort durchgeführt und ausgewertet werden kann, ein wichtiges Mittel, um die Verbreitung von Phytoplasmen einzudämmen. Ein solcher Nachweis auf Basis eines LAMP-Assays bzw. TaqMan-Assays wird daher im Projekt PhytoDiag in einer Zusammenarbeit der Hochschule Geisenheim und der Firma IDENTXX aus Stuttgart entwickelt.

124 - Application of next-generation sequencing for simultaneous detection of viruses, viroids and phytoplasmas in grapevine and fruit trees

Viren, Viroide und Phytoplasmen in Reben und Obstbäumen - Detektion von Mehrfachinfektionen mittels Hochdurchsatzsequenzierung

Kerstin Zikeli¹, Constanze Berwarth¹, Dennis Knierim², Christoph Hoffmann¹, Michael Maixner¹, Stephan Winter², Wilhelm Jelkmann¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau

²Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen GmbH

Next-generation sequencing (NGS) technologies are applied to a greater extent for detection of plant pathogens in the last years (Loconsole et al., 2012). Thus NGS is used for diagnostics of viral and virus-associated diseases of grapevines and fruit trees (Abbà et al., 2014, Rott et al., 2017).

Viral, viroidal and phytoplasma diseases cause severe crop losses in viticulture and orchards (Basso et al., 2017). Bois noir (a grapevine yellows disease associated with the phytoplasma species '*Candidatus Phytoplasma solani*'), European stone fruit yellows ('*Candidatus Phytoplasma prunorum*'), apple proliferation ('*Candidatus Phytoplasma mali*')

and pear decline ('*Candidatus Phytoplasma pyri*') belong to the most prevalent and economically important phytoplasma diseases of grapevine respectively of fruit trees in Europe (Seemüller & Schneider, 2004). The emergent symptoms of Grapevine enation disease (GED) have been reported in Germany in 2006. However, the etiology of GED, causing formation of enations on the underside of basal leaves and growth depression of infected plants, still remains unknown (Martelli, 2014). No correlation of RT-PCR detected virus species and occurrence of disease has been found so far.

Therefore NGS (Illumina MiSeq platform) was applied in this study for detection of viral and phytoplasmic infections in grapevine and fruit tree samples. Symptomatic or asymptomatic samples were analyzed and subjected to a NGS pipeline starting from total RNA extract for generating an untargeted metagenome dataset. Thus untargeted and unknown pathogens may be identified and a parallel detection of a huge variety of pathogens (viruses, viroids and phytoplasmas) using a single technology is feasible. Raw NGS data were analyzed using the bioinformatic software Geneious. This NGS approach enables the detection of low titer infections in tissues. Phytoplasmas (negatively tested by normal PCR assay) were detected in bois noir and pear decline samples. Beside viruses and phytoplasmas detected by PCR, further viruses and viroids were found to be present. In this study, NGS technology was applied for the parallel detection of phytoplasmas, viruses and viroids in a single grapevine or fruit tree sample.

Literature

- Abbà S., Galetto L., Carle P., Carrère S., Delledonne M., Foissac X., et al., 2014: RNA-Seq profile of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *BMC Genomics* 15 (1), 1088.
- Basso, M. F., Fajardo, T. V. M., & Saldarelli, P., 2017: Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura* 39 (1), e-411. Epub April 27, 2017.
- Loconsole, G., Giampetruzzi, A., Roberto, R., Saponari, M., Palmisano, F., Chiumenti, M., Morelli, M., Minafra, A., Savino, V. & Saldarelli, P., 2012: Next generation sequencing and metagenomic analysis advances plant virus diagnosis and discovery. *J. Plant Pathol.* 94 (4), 48.
- Martelli, G. P., 2014: Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* 96 (suppl. 1), 1-136.
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., Lawrence, T., Birch, C., Bhagwat, B. and Rast, H., 2017: Application of Next Generation Sequencing for Diagnostic Testing of Tree Fruit Viruses and Viroids. *Plant Disease* 101 (8), 1489-1499.
- Seemüller, E., Schneider, B., 2004: '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*', and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int J Syst Evol Micr* 54 (Pt 4), 1217-1226.

125 - Vorkommen der Ulmenvergilbung in einheimischen Ulmenarten in Deutschland

Occurrence of Elm Yellows Phytoplasma in native Elm Species in Germany

Bernd Schneider, Marlies Karaus, Heidrun Mattauch, Michael Kube

Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik

Die Ulmenvergilbung wird durch das vektorübertragene Bakterium *Candidatus Phytoplasma ulmi* verursacht. Diese Phytoplasmaose wurde bereits in mehreren europäischen Ländern beschrieben. Die Krankheit äußert sich durch die Bildung von Hexenbesen, Triebstauung, Vergilbung der Blätter sowie Phloemnekrosen. In Brandenburg sind bis zu 50 % der untersuchten Flatterulmen mit dem Quarantäneschadorganismus infiziert. Während das Pathogen in nordamerikanischen Ulmen starke Symptome verursacht und zu erheblichen Verlusten in den Populationen führt, sind in den brandenburgischen Ulmen phytoplasmasassoziierte Symptome selten.

Informationen über die Verbreitung des Erregers in Deutschland und die Auswirkung einer Infektion auf die Pflanzengesundheit sind bisher unzureichend. Daher wurde 2017 mit einem deutschlandweiten Monitoring der einheimischen Ulmen-Arten (*Ulmus glabra*, *Ulmus laevis* und *Ulmus minor*) begonnen. Die Infektion wird dabei mittels pathogenspezifischer quantitativer real time-PCR unter Verwendung neuer Sonden bestimmt. Durch die umfangreiche Anzahl von Proben soll die Verbreitung des Erregers in Deutschland erfasst werden. Weiterhin werden in Pathogenitätstests infizierte Reiser unterschiedlicher Herkunft auf gesunde Ulmensämlinge gepfropft, um die Virulenz der Erreger und die Anfälligkeit der Ulmen-Arten abzuschätzen. Die Ergebnisse sollen eine Risikoabschätzung und die Entwicklung von phytosanitären Strategien ermöglichen. Erste Ergebnisse werden präsentiert.

126 - Validierung des Ködertests mit Rhododendronblättern für ein routinemäßiges Monitoring von Probenmaterial auf Kontamination mit *Phytophthora ramorum* nach der EPPO-Richtlinie PM7/98 (2)

*Validation of the bait test with rhododendron leaves for routine monitoring of samples for contamination with *Phytophthora ramorum* according to the EPPO Guideline PM7/98 (2)*

Corina Junker, Sabine Werres

Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst

Im Rahmen des Projektes RESIPATH (BiodivERsA) wurde das Köderverfahren mit Rhododendronblättern nach der EPPO-Richtlinie PM7/98 (2) (European Plant Protection Organisation)* validiert. Es dient vor allem dem Nachweis von *Phytophthora ramorum* aus Boden, Wasser, Sediment und Wurzeln/Wurzelballen und soll als routinemäßiges Monitoring von Probenmaterial Anwendung finden. Dabei wurden folgende vorgegebene Parameter untersucht:

- Analytische Sensitivität
- Analytische Spezifität
- Wiederholbarkeit
- Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse zeigen eine hohe Sensitivität des Tests gegenüber niedrigen Konzentrationen der zu ködernden Menge, als auch eine hohe Robustheit untersucht in den Experimenten zu Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Projektes RESIPATH (BiodivERsA) durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Literatur

- THEMANN, K., WERRES, S. 1998: USE OF RHODODENDRON LEAVES TO DETECT PHYTOPHTHORA SPECIES IN ROOT AND SOIL SAMPLES. NACHRICHTENBLATT DES DEUTSCHEN PFLANZENSCHUTZDIENSTES. 50(2):37-45.
- THEMANN K., WERRES S., DIENER H.A., LÜTTMANN R., 2002: COMPARISON OF DIFFERENT METHODS TO DETECT PHYTOPHTHORA SPP. IN RECYCLING WATER FROM NURSERIES. JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 84 (1), 41-51.
- ANONYMOUS, 2014: PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for plant pest diagnostic activities. OEPP/EPPO Bulletin **44**, 1-31.

*Anonymous, 2015: Besondere Anforderungen für Laboratorien, die die Akkreditierung für die Diagnose von Schadorganismen von Pflanzen anstreben. Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) 71 SD 4 029, Revision: 1.1, 06.11.2015.

127 - Charakterisierung pilzlicher Schaderreger an Kamille (*Matricaria recutita* L.)

Characterisation of fungal pathogens of chamomille (Matricaria recutita L.)

Monika Götz¹, Katja Sommerfeld¹, Samad Ashrafi², Stefan Wagner¹, Ute Gärber¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst

²Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

Der Kamilleanbau, mit dem Hauptanbaugebiet Thüringen, galt lange Zeit als unproblematisch in Deutschland. Seit den 90er Jahren ist jedoch eine rückläufige Ertragsentwicklung zu beobachten, die unter anderem auf das Auftreten neuer Erkrankungen an Kamille (*M. recutita* L.) zurückzuführen ist.

In einem von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR Fördernummer = 22021213) geförderten Demonstrationsprojekt für Arzneipflanzen "Erkrankungen im Kamilleanbau – Erforschung der Ursachen und erste Lösungsansätze zur Bekämpfung" (KAMEL), wurden in den Jahren 2016/2017 Kamillepflanzen von Flächen zweier Praxisbetriebe auf potentielle Schaderreger hin untersucht.

Dazu wurden Pflanzen beider Kamilleausaaten zu mehreren Zeitpunkten in der Saison geerntet und im Labor analysiert. Es wurden unterschiedliche pilzliche Pathogene isoliert und morphologisch, biologisch und molekularbiologisch charakterisiert: *Septoria matricariae*, *Fusarium proliferatum*, *Trichoderma* sp. sowie ein unbekannter Pilz (UBK) des Phylums der Ascomyceten (Ordnung Helotiales).

Die Bedeutung der unterschiedlichen Pathogene für den Kamilleanbau wird diskutiert.

128 - *In situ* Immunfluoreszenz-Lokalisierung: Eine Methode zur einfachen Detektion von *Beauveria* spp. in Bodenproben

In situ immunofluorescence localization: A method for the rapid detection of Beauveria spp. in soil samples

Cornelia I. Ullrich¹, Frank Rabenstein², Eckhard Koch¹, Natascha Heil¹, Marta Matek³, Regina G. Kleespies¹

¹Julius Kühn Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz

²Julius Kühn Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

³Croatian Forest Research Institute, Division for Forest Protection and Game Management, Kroatien

Zur biologischen Bekämpfung von Schadinsekten z. B. Engerlingen, an Wurzeln von Apfelbäumen, Eichen oder Kiefern werden zunehmend und erfolgreich entomopathogene Pilze der Gattung *Beauveria* eingesetzt. Wichtig ist dabei die Erfolgskontrolle über die Ausbreitung und Persistenz der *Beauveria*-Inokulate, sowohl qualitativ als auch quantitativ. Die Bestimmung beider Parameter über Selektivnährböden oder mittels molekularer Methoden von Bodenproben aus Apfelanlagen oder von Eichen-/Kiefernwäldern erwies sich als aufwändig und häufig als nicht zufrieden stellend (CARD, 2018; KOCH et al., 2018; MCKINNON et al., 2017, 2018; ULLRICH et al., 2017). Deshalb entwickelten wir eine spezifische *in situ* Methode über Immunfluoreszenzmarkierung von *Beauveria* spp. an jungen Feinwurzeln aus diversen Böden, ohne Mikrotomie. Wurzelproben werden in p-Formaldehyd fixiert, vorsichtig gewaschen, mit polyklonalen anti-*Beauveria* IgG über Nacht bei 4°C inkubiert, anschließend für 2 Std. mit FITC-gekoppelten Sekundäntikörpern markiert und bis zur mikroskopischen Auswertung in dem Antifading Medium DABCO aufbewahrt. Somit werden die *Beauveria*-Spezies selektiv an Wurzelproben entweder am

Epifluoreszenzmikroskop oder vorzugsweise am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop erkennbar. *Beauveria brongniartii* konnte mit dieser Methode an Apfelwurzeln bis mindestens 1,5 Jahre und an Eichenwurzeln bis zu einem halben Jahr nachgewiesen werden.

Literatur

- CARD, S., 2018: Recension to: KOCH, E., P. ZINK, C. I. ULLRICH, R. G. KLEESPIES 2018: Light microscopic studies on the development of *Beauveria bassiana* and other putative endophytes in leaf tissues. Journal für Kulturpflanzen. **70** (3), 95-107, Journal für Kulturpflanzen **70** (3), 110-111, DOI: 10.1399/JFK.2018.03.02.r1.
- KOCH, E., P. ZINK, C. I. ULLRICH, R. G. KLEESPIES, 2018: Light microscopic studies on the development of *Beauveria bassiana* and other putative endophytes in leaf tissues. Journal für Kulturpflanzen **70** (3), 95-107.
- MCKINNON, A. C., S. SAARI, M. E. MORAN-DIEZ, N. V. MEYLING, M. RAAD, T. R. GLARE, 2017: *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. BioControl, **62** (1), 1-17.
- MCKINNON, A. C., T. R. GLARE, H. J. RIDGWAY, A. MENDOZA-MENDOZA, A. HOLYOAKE, W.K. GODSOE, J. L. BUFFORD, 2018: Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants. Frontiers in Microbiology **9**, doi: 10.3389/fmicb.2018.01161.
- ULLRICH, C.I., E. KOCH, C. MATECKI, J. SCHÄFER, T. BURKL, F. RABENSTEIN, R. G. KLEESPIES, 2017: Detection and growth of endophytic entomopathogenic fungi in dicot crop plants. Journal für Kulturpflanzen **69** (9), 291-302.

129 - Nachweis von Schildlausarten (Coccoidea) in Brandenburg

Detection of scale species (Coccoidea) in Brandenburg

Ute Schönfeld

Landesamt für ländliche Entwicklung, Landwirtschaft und Flurneuordnung

In den letzten Jahren sind im Rahmen der zoologischen Diagnostik im Pflanzenschutz eine Vielzahl von Proben mit Schildlausbefall untersucht worden. Die Proben stammten aus Gartenbaubetrieben, Baumschulen, dem Öffentlichen Grün, aus künstlichen tropischen Habitaten (Tropenhallen), aus Gartencentren, dem Einzelhandel und Innenräumen sowie von Pflanzenimporten aus Drittländern. Dabei sind zunehmend Arten festgestellt worden, die als Neozoen zu betrachten sind.

Im Erwerbsobstbau ist das die San-José-Schildlaus (*Quadraspidiotus perniciosus*), die im Jahr 2000 erstmals im Raum Frankfurt/O. bestimmt wurde und dort bisher heimische Arten in ihrer ökonomischen Bedeutung zurück gedrängt hat. Sie ist inzwischen auch im Havelländischen Obstanbau etabliert. Vorwiegend an Birne ist seit 2016 die Rote Austerschildlaus (*Epidiaspis leperii*) belegt. Auch die Pfirsichnapfschildlaus (*Parthenolecanium persicae*) tritt erst seit wenigen Jahren in Kulturheidelbeere schädigend auf.

An Gehölzen im Freiland haben Arten wie die Wollige Napfschildlaus (*Pulvinaria regalis*) sowie die Mandel- oder Maulbeerschildlaus (*Pseudaulacaspis pentagona*) ihre Verbreitung bis nach Brandenburg ausgedehnt. Eine Einschleppung mit Baumschulware ist belegt.

Ein hohes Risiko für Einschleppungen nicht nur gebietsfremder Schildlaus-Arten geht von Tropenhallen aus. An Proben dieser Herkunft wurden folgende für Brandenburg (und Deutschland) nicht belegte Arten gefunden: die Kokospalmenschildlaus (*Aspidiotus destructor*), die Bambuspockenschildlaus (*Bambusaspis bambusae*), die Rote Wachsschildlaus (*Ceroplastes rubens*), die Sternschildlaus (*Ceroplastes stellifer*), *Odonaspis greenii* und *Pseudaulacaspis cockerelli*. Auch die mit Baumschulware aus Italien und Japan eingeschleppte Japanische Wachsschildlaus (*Ceroplastes japonica*) und die Australische Wollschildlaus (*Icerya purchasi*) – gefunden in einem Gartencenter sowie einem Gartenbaubetrieb – gehören nicht zur heimischen Fauna.

Neben den o.g. „neueren“ Arten sind folgende Arten in Brandenburg festgestellt worden: In Innenräumen: *Abgrallaspis cyanophylli*, *Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus nerii* (syn. *hederae*),

Chrysomphalus dictyospermi, *Chrysomphalus ficus* (syn. *aonidium*), *Coccus hesperidum*, *Diaspis boisduvalii*, *Diaspis bromeliae*, *Eucalymnatus tessellatus*, *Furchadaspis zamiae*, *Hemiberlesia rapax*, *Parlatoria pergandii*, *Pulvinaria hydrangeae*, *Saissetia coffeae*, *Saissetia oleae*; In Baumschulen/ Öffentlichem Grün: *Carulaspis visci*, *Dynaspidiotus abietis*, *Eriococcus spurius* (syn. *Gossyparia spuria*); Im Erwerbsobstbau: *Diaspidiotus ostreaeformis*, *Diaspidiotus pyri*.

Dem Handel mit pflanzlicher Ware kommt bekanntermaßen ein hohes Risiko für die Einschleppung von nicht heimischen Schädlingarten zu. Besonders unter den sich verändernden Klimabedingungen können sich auch wärmeliebende Arten - wie das Beispiel der San-José-Schildlaus zeigt - in Brandenburg ansiedeln und das Schadausmaß bisher heimischer Arten relativieren. Obwohl molekulare Methoden in der Entomologie zum festen Bestandteil der diagnostischen Arbeit geworden sind, entziehen sich die Schildläuse bisher weitgehend dieser Diagnoseverfahren und werden vorrangig anhand morphologischer Merkmale bestimmt.

Literatur

<http://scalenet.info/>