
Poster

Diagnose- und Nachweisverfahren

122 - Ansatz zur Optimierung des molekularen Nachweises von Kartoffelviren

Approach for optimization of molecular biological detection of potato viruses

Johanna Stammler, Johannes Hadersdorfer, Michael Neumüller, Adolf Kellermann², Dieter Treutter²

Technische Universität München, Fachgebiet Obstbau

²Landesanstalt für Landwirtschaft, IPZ3a

Isothermale Methoden wie die Loop-Mediated Isothermal Amplifikation (LAMP, NOTOMI et al., 2000) sind Nukleinsäure basierte Nachweissysteme u.a. für Pathogene. Diese finden auf Grund ihrer kostengünstigen Anwendung im Agrarsektor immer breiteren Anklang und wird nun auch als Alternative zu DAS-ELISA und Onestep RT-qPCR für den Virusnachweis von Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) getestet. Dabei liegen die Vorteile in einer vereinfachten Probenaufbereitung und der kostengünstigen Geräteausstattung. Im Idealfall können die Ergebnisse mit dem bloßen Auge oder in Real-time mit interkalierenden Farbstoffen ermittelt werden.

Für *Potato virus Y (PVY)*, *Potato leaf roll virus (PLRV)*, *Potato virus M (PVM)*, *Potato virus S (PVS)* und *Potato virus A (PVA)* wurden jeweils mehrere LAMP-Primersets entwickelt. Für PVY wurde eine weitere isothermale Methode, Smart Amplification Process (SMAP, MITANI et al. 2007), getestet. In einem Selektionsverfahren wurde für jede Methode und jedes Virus ein vielversprechendes Primersetz für weitere Reaktionsoptimierungen ausgewählt.

Unter Verwendung aufgereinigter RNA ist der Nachweis von Kartoffelviren mit der LAMP prinzipiell möglich. Jedoch neigt diese Methode zu Hintergrundamplifikationen, die oftmals auch anhand des Bandenmusters in der Gelelektrophorese nicht eindeutig unterscheidbar sind. Somit ist diese Methode bis jetzt für Kartoffelviren nicht verlässlich durchführbar. Hinsichtlich dessen zeigt sich die SMAP stabiler. Jedoch ist hier ein indirektes Visualisierungsverfahren wie z.B. der Nachweis von Pyrophosphat, das unter Abspaltung beim Einbau von Desoxynucleotridiphosphaten in die DNA entsteht (GOTO et al. 2009), aufgrund der geringeren Amplifikationsrate im Vergleich zur LAMP undeutlicher.

Eine vereinfachte Probenaufbereitung wie bei HADERSDORFER et al. (2011) konnte bei beiden isothermalen Methoden bisher nicht etabliert werden. Vielversprechend ist hier die Anwendung von sog. Direct-Plant-PCR Kits zum Nachweis von genomischer DNA. Hierfür wird Pflanzenmaterial in Puffer homogenisiert und direkt in die PCR eingesetzt. Zum Nachweis von PVY in Kartoffelblätter und Kartoffelknollen läuft das Kapa3G Plant PCR Kit (PepLab) ergänzt mit einer Reversen Transkriptase, den PVY-PCR-Primern nach SCHUBERT et al. 2006 und einer intronspannenden internen Kontrolle *nad5* (SEIGNER et al. 2008) zuverlässig.

Grundsätzlich sind isothermale Methoden, bei vergleichbarer oder höherer Sensitivität, eine interessante Alternative zur PCR hinsichtlich des Geräteaufwands und der Ergebnisvisualisierung. Jedoch zeigt das Beispiel Kartoffelviren auch deren mögliche Probleme auf, die die Zuverlässigkeit bzw. einfache Anwendung dieser Methoden beeinflussen.

Literatur

- GOTO, M., HONDA, E., OGIURA, A., NOMOTO, A. AND HANAKI, K.-I. 2009: Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques* 46, 167–172.
- HADERSDORFER, J., NEUMÜLLER, M., TREUTTER, D., FISCHER, T. C. 2011: Fast and reliable detection of plum pox virus in woody host plants using the blue LAMP protocol. *Ann. of Appl. Biol.* 159, 456–466.
- MITANI, Y., LEZHAVA, A., KAWAI, Y., KIKUCHI, T., OGUCHI-KATAYAMA, A., KOGO, Y., USU, 2007: Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch suppression technology. *Nature* 4 (3), 257–262.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.

SCHUBERT, J., FOMITCHEVA, V., SZTANGRET-WIŚNIEWSKA, J. 2007: Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J. Virol. Methods* 140, 66-74.

SEIGNER, L., KAPPEN, M., HUBER, C., KISTLER, M., KÖHLER, D. 2008: First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *J. Plant Dis. Protect.*, 115 (3), 97–101.

123 - Nachweis des *Cherry leaf roll virus* in gepfropften *Betula pubescens* finnischer Herkunft mittels (semi-) nested RT-PCR

Detection of Cherry leaf roll virus in grafted Betula pubescens from Finish accessions by (semi-) nested RT-PCR

Rana Demiral¹, Artemis Rumbou¹, Risto Jalkanen², Susanne von Bargaen¹, Carmen Büttner¹

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland, phytomedizin@agrar.hu-berlin.de

²The Finnish Forest Research Institute Metla, Northern Research Unit, Eteläranta 55, 96300 Rovaniemi, Finland

Seit 2002 werden in Finnland insbesondere an der Birkenart *Betula pubescens* (Moorbirke) zunehmende Symptome wie Blattrollen, Chlorosen und Nekrosen beobachtet, die mit Degenerations- und Absterbeerscheinungen der Bäume einhergehen. Symptome dieser Art sind für das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) charakteristisch (JALKANEN et al. 2007, BÜTTNER et al., 2011). CLRV ist ein *Nepovirus* der Subgruppe C (Familie *Secoviridae*) und besteht aus einem bipartitem, einzelsträngigen, positiv orientierten RNA-Genom. Bisherige Studien haben gezeigt, dass es schwierig bzw. nicht immer möglich ist, CLRV in Birken finnischer Abstammung nachzuweisen (BREUHANN, 2013). Aufgrund dieser Problematik wurden (semi-) nested RT-PCR Verfahren entwickelt, um drei verschiedene Bereiche des CLRV Genoms zu amplifizieren. Zur Testung wurden 19 *B. pubescens* eingesetzt, die 2011 mit Reisern CLRV-infizierter *B. pubescens* aus Rovaniemi (Finnland) gepfropft wurden. In dieser Studie konnte mithilfe der (semi-) nested RT-PCR gezeigt werden, dass 18 Bäume CLRV-infiziert waren. Mindestens eine der drei Genom-Regionen des CLRV (RdRp, CP, 3' UTR) konnte in der Mehrzahl der Bäume detektiert werden. Darüber hinaus belegten die Ergebnisse, dass die *nested* bzw. *semi-nested* RT-PCR gegenüber einer einstufigen RT-PCR zur CLRV Detektion eine größere Empfindlichkeit aufwies. Diese Ergebnisse korrelieren im Wesentlichen mit dem Auftreten von CLRV-typischen Symptomen an den Blättern der untersuchten Birken im Vegetationsverlauf des Jahres 2013. Das Virus konnte auch in *B. pubescens* detektiert werden, die keine Virusverdächtigen Symptome entwickelten. Die CLRV-Infektion der Bäume konnte durch Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten Bereiche des Virusgenoms bestätigt werden. Ein Sequenzvergleich mit bisher charakterisierten CLRV-Isolaten der Datenbank des NCBI zeigt, dass die CLRV-Varianten in den gepfropften Moorbirken überwiegend der phylogenetischen Gruppe A (REBENSTORF et al. 2006) zuzuordnen sind.

Literatur

BREUHANN M., 2013: Evaluation of and virus detection in *Betula* spp. grafted with Cherry leaf roll virus-infected scions of German and Finnish provenance. BSc-Arbeit Humboldt-Universität zu Berlin, 63 S.

BÜTTNER C., VON BARGEN S., BANDTE M., MYRTA A., 2011: Cherry leaf roll virus. In: Hadidi A, Barba M., Candresse T., Jelkmann W., eds. *Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruit*. Minnesota, USA: APS Press, 119–25.

JALKANEN R., BÜTTNER C., VON BARGEN S., 2007: Cherry leaf roll virus abundant on *Betula pubescens* in Finland. *Silva Fennica* 41 (4): 755-762.

REBENSTORF K., CANDRESSE T., DULUCQ M.J., BÜTTNER C., OBERMEIER C., 2006: Host species dependent population structure of a pollen-borne plant virus, Cherry leaf roll virus. *Journal of Virology* 80, 2453-2462.

124 - Development of a Multiplex TaqMan Real-Time PCR Assay for Sensitive and Rapid Detection of Phytoplasmas Infecting Rubus Species

Holger Linck, Erika Krüger, Annette Reineke

Hochschule Geisenheim University

Rubus stunt, a disease associated with phytoplasma infections in wild and cultivated *Rubus* species, is a major challenge in the production of raspberries (*Rubus idaeus* L.), blackberries (*Rubus fruticosus* L.), and loganberries (*Rubus x loganobaccus*) throughout Europe, north-eastern USA, and Turkey. Symptoms range from stunting, shoot proliferation, small leaves, short internodes, enlarged sepals, phyllody, and flower proliferation to fruit malformations. Phytoplasmas are cell wall-less bacteria inhabiting the phloem and are transferred by phloem feeding insects. As the time between infection of a plant and the development of disease symptoms can take up to 1 year and *Rubus* plants are produced by vegetative propagation, an early detection of phytoplasmas using highly sensitive and rapid molecular methods is of great importance to minimize their spread. Thus far, phytoplasmas belonging to the 16Sr groups of elm yellows (16SrV), X disease (16SrIII), aster yellows (16SrI), and stolbur (16SrXII) have been identified in *Rubus* species. Therefore, in this study, two multiplex real-time PCR assays using TaqMan probes in combination with up to four different kinds of fluorophores in the same reaction were developed. The assay combines TaqMan probes previously published in literature with newly designed probes, allowing a rapid and simultaneous detection of phytoplasmas in general as well as a more specific detection of the above mentioned groups of phytoplasmas infecting *Rubus* species. In addition, a primer and probe set for the detection of plant host DNA was used as an internal control, enabling both the conformation of a successful DNA extraction and the exclusion of false negative results due to potential inhibition of the PCR. This assay will now be used to monitor presence and distribution of phytoplasmas in *Rubus* plants of different geographic origins, cultivars and cultivation systems as well as in putative insect vectors like leafhoppers.

125 - Praxiserfahrungen mit dem BIOTEST zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (CMS)

Practical experience to detect Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus (CMS) by using bioassay

Uwe Preiß, Hiltrud Mather

Dienstleistungszentrum ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück Rüdesheimer Strasse 60-68, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland, uwe.preiss@dlr.rlp.de

Akkreditierung, Validierung und Verifizierung von Untersuchungsmethoden sind in den Pflanzenschutzlaboren von zunehmender Bedeutung. Insbesondere die Quarantäneschadorganismen wie *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (CMS) stehen dabei im Focus. In Rheinland-Pfalz wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um den BIOTEST auf *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (CMS) zu mit abgesicherten Prüfergebnissen zu untermauern.

Das Prüfverfahren wird nach OEPP/EPPO Diagnostic protocol of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* OEPP/EPPO, Bulletin 36, PM 7/59 (1), S. 99–109 von 2006 durchgeführt. Gemäß den Vorgaben der EPPO durch die Festlegung der Standards für Diagnoselabore Diagnostics - Basic requirements for quality management in plant pest diagnosis laboratories (OEPP/EPPO 2007) und Diagnostics - Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity (OEPP/EPPO 2010) gliedern sich die Untersuchungsschwerpunkte nach den fünf analytischen Kenngrößen.

Diese werden in den DAkkS-Vorgaben 71 SD 4 029, Revision: 1.0, 10.09.2012 „Besondere Anforderungen für Laboratorien, die die Akkreditierung für Diagnose von Schadorganismen von Pflanzen anstreben“ ebenso wiedergegeben.

Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die Pflanzengröße (Wachstumsstadium), die Sorte der eingesetzten Auberginen-Testpflanzen als auch der physiologische Zustand zum Zeitpunkt der Inokulation Auswirkungen auf den Erfolg des Biotests haben.

Bei der Prüfung verschiedener Auberginen-Sorten kamen neben der Standardsorte 'Black Beauty' z.B. 'Antar', 'Lange Violette', 'Rotonda bianca', 'Sumata Di Rosa' zum Einsatz. Zur Vorbereitung der Testpflanzen auf die Inokulation hat es sich bewährt die Auberginen in Multiseedpaletten vorzuziehen und erst einen Tag vor der Inokulation in 11-er Töpfe mit dem entsprechenden Torfsubstrat umzutopfen, ohne diese anzugießen. Dieser „standardisierte Trockenstress“ sorgt für einen geringen Tugor, der es ermöglicht die Testpflanzen mit den erforderlichen 10 µl Bakterien-suspension zu injizieren.

Das Eingesetzte Inokulum bei den vorliegenden Untersuchungen lag zwischen 10² und 10 Zellen je Milliliter. Bei der Reisolierung, 4 Wochen nach Inokulation, war CMS aus den Testpflanzen mit einer Inokulationskonzentration ab 10³ Zellen je Milliliter stets nachweisbar.

Das Ausbilden typischer Symptome konnte nicht immer festgestellt werden. Evtl. genotypische Veranlagung zeigte zum Teil stark infizierte Pflanzen kaum Symptome zum anderen wurden bei Pflanzen mit geringeren Infektionen Symptome festgestellt.

126 - Entwicklung eines PCR-basierten Verfahrens zum Nachweis von *Agrobacterium vitis* (Mauke) in Weinreben

Development of a PCR-based method to detect Agrobacterium vitis (Crown Gall) in vines

Frank Brändle, Sven Keil

IDENTXX GmbH

In den vergangenen Jahren konnte ein vermehrtes Auftreten der Mauke-Krankheit bei Reben, hervorgerufen durch den Erreger *Agrobacterium vitis*, beobachtet werden. Der Krankheitsausbruch zeigt sich in teils umfassenden, hellbraunen Gewebewucherungen (Tumoren) am Stamm, unter Umständen aber auch an den verholzten Trieben. Dieses Kallusgewebe, welches von sehr unterschiedlicher Größe sein kann und sich im Laufe der Zeit dunkel färbt, bildet keine Rinde aus und ist deshalb vergleichsweise weich. Die Wucherungen sind meist am Stamm über der Veredelungsstelle zu finden und können manchmal den ganzen Stamm erfassen. Da dem wuchernden Gewebe die Rinde fehlt, kann es vertrocknen (und daruntergelegene Leitungsbahnen werden geschädigt). An dieser Stelle können weitere Schaderreger eindringen und im Stamm zusätzliche Schäden verursachen. Tritt die Mauke-Krankheit bei frisch geplanten Reben auf, führt dies oftmals zum Totalverlust der gesamten Pflanze. Da das Bakterium durch latent infiziertes Vermehrungsmaterial übertragen werden kann, ist die Krankheit auch für Rebenzüchter und Rebveredler von großer Bedeutung.

Im Rahmen des Zentralen Innovationsprogramms Mittelstand (ZIM) wurde in einem 3-jährigen Verbundprojekt neben biologischen Grunddaten zur Biologie und Übertragbarkeit von *A. vitis* ein neues PCR-basiertes Nachweissystem entwickelt. Dieser Schritt war notwendig, da bisher publizierte PCR-Systeme zwar positiv auf die Reinkulturen der im Rahmen des Projektes gesammelten Isolate reagierten, jedoch die gleichen Isolate in künstlich infiziertes Rebholz nicht zufriedenstellend nachweisbar waren. Als Grund hierfür konnte durch die Untersuchung der entsprechenden Primerbindestellen ermittelt werden, dass hier bis zu drei Basenunterschiede zwischen den Isolaten vorkommen. Diese Polymorphismen können bei der Identifikation von Reinkulturen vernachlässigt werden, da ein Überschuss an Zieltemplate vorliegt. Sie führen bei Realproben, welche ein DNA-Gemisch darstellen, das zudem Störstoffe vom co-extrahierten Rebholz enthält, jedoch zu

Problemen beim Primer-Annealing führen, was eine Replikation und somit den Nachweis der Zielsequenz verhindert.

Auf Basis von 72 Feld- und 15 Referenzisolate wurde daher ein neues PCR-basiertes Nachweissystem entwickelt. Hierfür wurden Teilbereiche des Polygalacturonase (pehA) und des Nicotinsäure-Phosphoribosyltransferase-Gens (nprt) erhoben. Die Lage sowohl der Primer als auch der TaqMan[®]-Sonden wurde so gewählt, dass keine Polymorphismen im Bereich der Bindestellen liegen. Durch die anschließend durchgeführte Untersuchung von künstlich infizierten Reben konnte die optimierte Funktionsweise des neuen Nachweissystems belegt werden.

Seit dem Frühjahr 2014 wird das System in der Praxis für den Neuaufbau von Rebklonen eingesetzt und leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Qualitätssicherung in der Rebpfanzgutproduktion.

127 - Die Mauke der Rebe: Untersuchungen zu potentiellen Übertragungswegen und Entwicklung einer sicheren Diagnose latenter Infektionen

Crown Gall Disease of Grapevine: Investigation of potential transmission paths and development of a safe diagnostic procedure of latent infections

Mario Braun, Günther Buchholz, Joachim Eder², Götz M. Reustle

RLP AgroScience GmbH/AIPlanta - Institute for Plant Research, Neustadt / W., Germany

²DLR Rheinlandpfalz – Abteilung Phytomedizin

Die Mauke der Weinrebe ist die wichtigste bakterielle Krankheit an Reben in den nördlichen und östlichen Weinanbauregionen Europas. Der Erreger ist das Gram-negative Bakterium *Agrobacterium vitis*, das latent in den Wasserleitbahnen der Pflanze vorliegen kann. Frostrisse im Holz können schwere Krankheitsausbrüche verursachen. So sind Weinberge in Klimazonen mit kalten Wintern anfälliger für Schäden, die sich als Wucherungen im Holz darstellen. Da die Tumorbildung im Kambium eingeleitet wird, wo die sich teilenden Zellen besonders anfällig für diese Infektion, ist vor allem die Entwicklung des Gefäßgewebes betroffen. Die infizierten Kambiumzellen werden durch die Übertragung und Expression *A. vitis* eigener Gene, die für Enzyme für die Überproduktion von Pflanzenwachstumshormonen und spezifischer Nährstoffe (Opine) für das Pathogen codieren, umprogrammiert. Der eingeschränkte Nährstofffluss, kann zu reduzierter Vitalität und reduziertem Wachstum des Rebstocks und damit zu verringertem Ernteertrag und Qualität des Lesegutes führen. Neben der Gallenbildung verursacht *A. vitis* Nekrosen an jungen Wurzeln.

Jenseits einer natürlichen Infektion über die Wurzeln oder durch Verwundungen, wird die Verbreitung durch latent infiziertes Pflanzenmaterial im Veredelungsprozeß als wichtigster Weg für die Ausbreitung der Krankheit angesehen. Daher wäre ein verlässliches Verfahren zum Nachweis von latent infiziertem Vermehrungsmaterial sehr wichtig für Rebzüchter und Rebveredler.

Im Rahmen eines von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungs (AIF)-Projekt GmbH koordinierten und vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) geförderten Projektes, wurde in Zusammenarbeit mit IDENTXX GmbH die Entwicklung einer realtime-PCR-basierten *A. vitis*-Detektion in latent infiziertem Holzmaterial bearbeitet.

Dafür wurde eine stabil transformierte RFP (rot-fluoreszierendes Protein; dTomato) exprimierende *A. vitis*-Linie zur visuellen Lokalisierung im Gewebe für eine optimierte Probennahme, etabliert. Mit dieser Linie konnte außerdem die Lokalisierung und die Migration in den Geweben und die potenziellen Infektionsmöglichkeiten während des Veredelungsprozesses untersucht werden.

128 - Entwicklung von *Rhizoctonia solani* Kühn an Kartoffelschnittlingen

Studies on the development of Rhizoctonia solani Kühn on potato plantlets

Franziska Genzel, Kerstin Lindner², Katja Muders³, Rita Grosch

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Theodor Echtermeyer Weg 1, 14979 Großbeeren, Deutschland, genzel@igzev.de, grosch@igzev.de

²Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland

³Norika GmbH, Nordring- Kartoffelzucht- und Vermehrungs- GmbH Groß Lüsewitz, Parkweg 4, 18190 Sanitz, Deutschland, muders@norika.de

Rhizoctonia solani Kühn ist ein weit verbreiteter bodenbürtiger Erreger, verantwortlich für ökonomisch relevante Ertragsverluste an zahlreichen Kulturen. Das Auftreten des Erregers an der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) ist ein Problem in nahezu allen Kartoffelanbaugebieten weltweit. Nach Berichten aus der Praxis haben in den letzten Jahren die durch *R. solani* verursachten Qualitätsverluste im Kartoffelbau an wirtschaftlicher Bedeutung zugenommen. Derzeit verfügbare Bekämpfungsmaßnahmen sind unzureichend wirksam. Daher ist die Verfügbarkeit neuer Bekämpfungsstrategien dringend erforderlich. Der Anbau von Sorten mit Resistenz gegen *R. solani* ist eine wirksame Bekämpfungsmaßnahme. Zur Resistenz gegenüber *R. solani* in marktfähigen Sorten bzw. im Genpool der Züchterhäuser stehen jedoch keine Informationen zur Verfügung, da dieses Merkmal bisher in der Züchtung aufgrund fehlender Testverfahren nicht berücksichtigt wurde. Ziel eines Forschungsvorhabens ist die Entwicklung einer Resistenzprüfmethode, deren Bereitstellung der Züchtung erlaubt, das Resistenzpotential in marktfähigen Sorten bzw. im Genpool der Kartoffel gegenüber *R. solani* zu prüfen. Die Verwendung von in vitro produzierten Kartoffelschnittlingen gewährleistet eine Befallsfreiheit von Pathogenen. Zunächst wurde die Entwicklung von *R. solani* an Schnittlingen unter Gewächshausbedingungen untersucht. Diese wurden mit *R. solani* AG-3 inokuliert und der Erreger zu verschiedenen Zeitpunkten in der Wurzel quantifiziert. Ein signifikanter Einfluss von *R. solani* auf die Spross- und Wurzelrockenmasse sowie die Anzahl und Masse an gebildeten Knollen konnte innerhalb des Versuchszeitraums von 6 Wochen nicht nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung des Erregers im Pflanzengewebe wurde zunächst eine qPCR etabliert. Bis 4 Wochen nach der Erregerinokulation war eine signifikante Zunahme von *R. solani* in der Wurzel mittels qPCR zu verzeichnen. Sechs Wochen nach der Inokulation von *R. solani* war im Vergleich zur Gesamtwurzelmasse keine weitere Zunahme der Erregermenge in der Wurzel zu beobachten.

129 - Differenzierung verschiedener *Verticillium*-Arten an Meerrettich mittels molekularbiologischer Methoden

Differentiation of various Verticillium species of horseradish via molecular biological methods

Annette Block, Bernhard Hauser, Anne Heinke, Gisela Westermeier, Birgit Zange

Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Am Hofgarten 4, 85354 Freising, Deutschland

Ein Befall mit *Verticillium* spp. kann in vielen landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturen große wirtschaftliche Schäden verursachen. In Meerrettich kommen insbesondere drei verschiedene *Verticillium*-Arten in Betracht, die zu Ertragsausfällen und Qualitätseinbußen bei der Verarbeitung führen. An der HSWT wurde eine Methode entwickelt, die diese drei *Verticillium*-Arten (*V. dahliae*, *V. longisporum* und *V. tricorpus*) unterscheidet.

Sie basiert auf der Kombination drei spezifischer PCR-Systeme (Tab. 1). Das erste ITS-System dient dem Nachweis PCR-fähiger DNA basierend auf dem Primerpaar ITS1+ITS4 [1; 4]. Mit Meerrettich-DNA produziert es Amplikons von ~740bp Länge. Bei ausreichender Menge an *Verticillium*-DNA sind zudem PCR-Produkte von ~570bp sichtbar. Die beiden folgenden PCR-Systeme dienen der

Differenzierung der genannten *Verticillium*-Arten. Das Primerpaar Eppo 19+22 [3], amplifiziert spezifisch *V. dahliae* und *V. tricorpus* mit ~ 550bp. Das dritte PCR-System basiert auf Sequenzbereichen eines pilzlichen Paarungsgens (MAT, mating type gen) und wurde an der HSWT für die spezifische Detektion von *V. longisporum* und *V. tricorpus* entwickelt. Es amplifizieren bei diesen beiden *Verticillium*-Arten PCR-Produkte von ~1100bp Länge, *V. dahliae* wird nicht detektiert. Die PCRs wurden mit der FirePol® - und GoTaq® Hot Start DNA Polymerase (Medibena, Promega) etabliert. Die Methode bietet gegenüber einer Isolierung von Einzelsporen mit nachfolgender Sequenzierung eine einfache und relativ kostengünstige Möglichkeit, die drei *Verticillium*-Arten zu unterscheiden. In folgenden Arbeiten wird sie an der HSWT dazu genutzt, die Pathogenität der verschiedenen Arten in Meerrettich zu beschreiben. Aufgrund der vegetativen Vermehrung hat die Methode darüber hinaus eine wichtige phytosanitäre Bedeutung für den Anbauer, da sie die Auswahl gesunder Fehser ermöglicht.

Tab. 1 Oligonukleotide zum Nachweis von *Verticillium* spp. an Meerrettich

Name	Sequenz (5'-3')	TA	Target	Literatur
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	60°C	Internal transcribed Spacer (rDNA)	[1]+[4]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
Eppo 19	CGGTGACATAAATACTGAGAG	62°C	Keine Angabe	[3]
Eppo 22	GACGATGCGGATTGAACGAA			
MAT_Vert4F*	CGACAGCTTGATTGACAGCG	62°C	mating type protein	[2] *HSWT
MATa1r[2]	TTTAGCTCATTGTATTGCTCAA			

[1] WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY J.J., WHITE TJ, eds). Academic Press, New York, USA, 315–322.

[2] Inderbitzin P., Davis R. M., Bostock R M., Subbarao K. V. (2001): The Ascomycete *Verticillium longisporum* is a Hybrid and a Plant Pathogen with an Expanded Host Range. PLoS ONE 6 (3), 1–13.

[3] ANONYMUS. *Verticillium albo-atrum* und *V. dahliae* on hop. Bulletin OEPP/EPPO 37:528–535.

[4] FAHLESON J., HU Q., DIXELIUS C. (2004): Phylogenetic analysis of *Verticillium* species based on nuclear and mitochondrial sequences. Arch Microbiol 181, 435–442.

130 - Nachweis von *Verticillium dahliae* in Kulturböden als Basis für die Einschätzung des Krankheitsrisikos - 15 Jahre Bodenanalyse in Deutschland

Detection of Verticillium dahliae in Soil as a Basis for Disease Risk Prediction - 15 Years Soil Analysis in Germany

Christian Neubauer, Monika Heupel², Thomas Brand³

Fakultät für Agrarwissenschaften Fachhochschule Osnabrück

²Landwirtschaftskammer NRW, Pflanzenschutzdienst

³Landwirtschaftskammer Niedersachsen

Die Gefäßwelke ausgelöst durch den pilzlichen Erreger *Verticillium dahliae* verursacht in Deutschland vor allem in der Produktion von Erdbeeren und im Baumschulbereich erhebliche ökonomische Verluste. Aufgrund der langen Lebensdauer der gebildeten Mikrosklerotien und des sehr weiten Wirtspflanzenkreises haben Fruchtfolgemaßnahmen wenig Effekt auf das Inokulum im Boden. Die Anwendung chemischer Bodenentseuchungsmittel ist nicht zulässig. Dem Produzenten

ten bleibt deshalb als einzige vorbeugende Maßnahme die Einschätzung des Bodeninokulums und daraufhin zielgerichtete Flächenauswahl als Ausweg.

Für die Bodenanalyse des Inokulums und Einschätzung des Krankheitsrisikos wurde vor 15 Jahren ein Test entwickelt, der heute in Deutschland und den angrenzenden Ländern breite Anwendung findet.

Der Nachweis der Mikrosklerotien des Erregers *Verticillium dahliae* erfolgt nach einer Nasssiebung und Ausplattierung des Bodens auf einem Pektat-Selektivmedium. Eine strenge Standardisierung der Analyse im Labor ermöglicht eine hohe Nachweissicherheit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse. Seit 15 Jahren führen die Labore der Pflanzenschutzdienste Oldenburg und Bonn sowie der Fachhochschule Osnabrück mit diesem Test 800-1000 Bodenuntersuchungen jährlich durch. Regelmäßige Ringversuche gewährleisten dabei die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Das Verfahren bietet eine ausreichende Wiederholbarkeit der Ergebnisse.

Eine Differenzierung der pilzlichen Erreger *Verticillium dahliae* und *Verticillium longisporum* kann mit diesem Verfahren nicht gewährleistet werden. Für eine Bewertung der Testergebnisse muss deshalb die Fruchtfolge der Praxisschläge bekannt sein

Umfangreiche Feldversuche haben die signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Bodenverseuchung und den auftretenden Pflanzenschäden in Erdbeeren oder Ahornpflanzungen belegt. Für Erdbeeren wurde auf diesen Versuchen basierend ein 5-Klassen-System für die Gefährdungseinstufung entwickelt. Dieses Verfahren hat in der praktischen Anwendung große Akzeptanz gefunden und ist eine erfolgreiche Maßnahme des Integrierten Pflanzenschutzes.

131 - Selektion resistenter Salatsorten mittels Chlorophyllfluoreszenz-Bildanalyse bei *Bremia lactucae*

*Selection of resistant lettuce cultivars using chlorophyll fluorescence imaging on *Bremia lactucae**

Elke Bauriegel, Hanna Brabandt, Ute Gärber, Werner B. Herpich

Die zunehmende räumliche und rassenspezifische Variabilität des *Bremia-lactucae*-Erregers bei Salat erschwert die Züchtung neuer, gegenüber Falschem Mehltau resistenter Sorten erheblich. Im Rahmen eines BLE-Projektes wurde ein System entwickelt, das die Möglichkeit nutzt, resistente Linien von Kopf- und Bataviasalat mittels bildgebender Chlorophyllfluoreszenzanalyse (CFA) gegenüber anfälligen Linien zu bestimmen. Um möglichst praxisnah zu arbeiten, bauen die Untersuchungen mit der CFA auf bestehende visuelle Methoden zur Testung der Anfälligkeit von Kopfsalat- und Batavia-Sorten auf und wurden auf diese abgestimmt. Als einfach und schnell bestimmbarer CFA-Parameter für die Vitalität der Pflanzen wurde die maximale photochemische Effizienz des Photosystems II (F_v/F_m) genutzt. In Klimakammern wurden unter kontrollierten Bedingungen Tests an 7 bis 21 Tage alten Keimlingen durchgeführt. Bei Blattscheibentests wurden Blattstücke aus Laubblättern drei Monate alter Pflanzen ausgestanzt, inokuliert und in einer feuchten Kammer bei 15°C und 12 h Belichtung mit der Rasse Bl:18 inkubiert. Die begleitende visuelle Bonitur nahm Befallsgrad und -intensität, Infektionsgrad mit Sekundärpilzen und auftretende Blattschäden routinemäßig auf.

Mit zunehmendem Befallsgrad nahm F_v/F_m signifikant ab. Es wurde ein Algorithmus entwickelt, der die Ungleichverteilung der Pixelwerte von F_v/F_m (0-0,84) bei totem bzw. gesundem Gewebe analysiert. Bei zeitig einsetzendem sichtbarem Befall (5 dai; days after inoculation) war es mithilfe der CFA möglich, zwischen dai 4-8 resistente und anfällige Sorten zu unterscheiden. Befall unter 5% der Blattfläche konnte noch nicht erkannt werden. Für die Befallserkennung bei später einsetzendem bzw. niedrigem Befallsdruck bedarf es noch spezieller optimierter Auswertalgorithmen.

132 - Etablierung eines Multiplex PCR-Verfahrens zum sicheren Nachweis der geregelten Schadorganismen *Meloidogyne chitwoodi* und *M. fallax*

Establishment of multiple PCR technique for a reliable detection of quarantine pest organisms Meloidogyne chitwoodi and M. fallax

Kerstin Müller, Sabine Fabich², Bernd Augustin²

Fachhochschule Bingen, Berlinstr. 109, 55411 Bingen, Deutschland, Kerstinmueller85@web.de
²DLR RNH, Rüdeshheimerstr. 60, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland, sabine.fabich@dlr.rlp.de

Im Rahmen der Überwachung von Pflanzenbeständen und zur Erfüllung der Pflanzenbeschau Verordnung müssen die Pflanzenschutzdienste der Länder Verfahren für einen sicheren und justiziable Nachweis geregelter Schadorganismen, wie *Meloidogyne chitwoodi* und *M. fallax* vorhalten. Die Differenzierung der Arten erfolgte ursprünglich anhand taxonomischer Merkmale am Mikroskop. Das erfordert die Untersuchung zahlreicher Einzeltiere und speziell geschultes Personal. Entsprechend hoch ist der Zeitaufwand.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein bewährtes molekularbiologisches Verfahren zur sicheren Identifizierung definierter Species. Im Rahmen der Untersuchungen wurde ein Multiplex-PCR-Verfahren entwickelt, bei dem gleichzeitig auf die DNA verschiedener *Meloidogyne*-Arten untersucht wird. Dabei wurde insbesondere die Nachweissicherheit unter den gegebenen Praxisbedingungen (Mischproben, Verunreinigungen, Larvensuspensionen) überprüft. Zunächst wurden passende Primer für die vier Arten *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita* und *M. hapla* geprüft, indem die Reaktion mit der jeweiligen DNA der Nematoden separat gestartet wurde. Anschließend wurden Mischproben aus der DNA mehrerer *Meloidogyne*arten getestet. Die Sensitivität der Reaktion wurde mit abgezählten Einzellarven bestimmt. Die Bestimmungsgrenze lag bei zwei Larven/*Meloidogyne*-Art.

Schließlich wurden Extrakte aus Erd- oder Pflanzenmaterial mit *Meloidogyne*larven versetzt und anschließend mit der PCR untersucht. Trotz möglicherweise vorhandener Störstoffe waren die Bandenmuster unverändert.

M. fallax und *M. chitwoodi* kann nach der Gelelektrophorese eine DNA-Fragmentlänge von ca. 550 Basenpaaren (bp) zugeordnet werden. Für eine Differenzialdiagnose muss anschließend ein Restriktionsverdau mit dem Enzym Rsa I durchgeführt werden. Das von *M. fallax* stammende DNA-Fragment wird dabei in eine ca. 450 bp und eine ca. 100 bp lange Sequenz geschnitten, anhand welcher dann die endgültige Zuordnung der Art erfolgen kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des Multiplex-PCR-Verfahren eine sichere Identifizierung von *M. hapla* und den Quarantänenematoden *M. chitwoodi* und *M. fallax* möglich ist. Die Species *M. incognita* ist dagegen nicht eindeutig mit dem PCR-Verfahren nach Zijlstra identifizierbar, da diese Art im untersuchten rDNA-Bereich homolog zu mindestens drei weiteren *Meloidogyne*arten ist (*M. arenaria*, *M. javanica*, *M. enterolobii*).

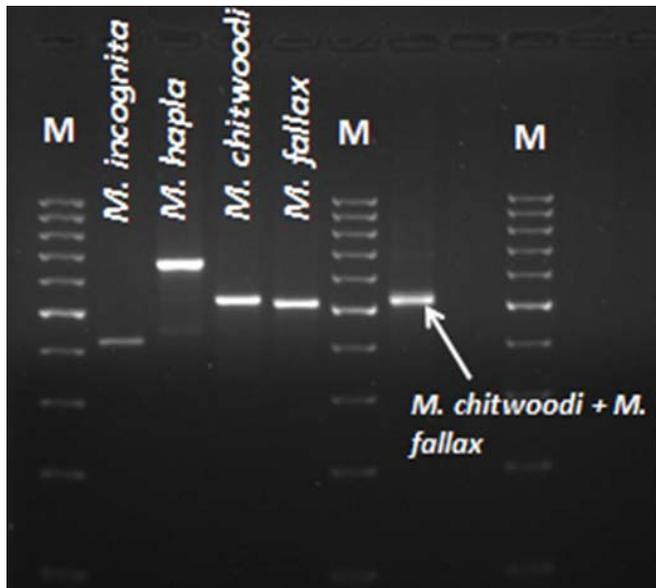


Abb. 1 Bandenmuster der amplifizierten Sequenzen (Primer H18S, CF-ITS, I-ITS, HCFI-28S), M: Marker 100 bp Ladder (Fermentas)

Literatur

- BLOK, V.C., M.S. PHILLIPS, M. FARGETTE, 1997: Comparison of Sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes. *Journal of Nematology* **29** (1): 16-22.
- WISHART, J., M. S. PHILLIPS, V. C. BLOK, 2002: Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology* **92** (8): 884-892.
- ZIJLSTRA, C., A.E. LEVER, B.J. UENK, C.H. VAN SILFHOUT, 1995: Differences between ITS regions of isolates of root knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* **85** (10): 1231-1237.
- ZIJLSTRA, C., 1997: A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundamental and applied Nematology* **20** (5): 505-511.