
Sektion 30

Diagnose / Schaderregernachweis

30-1 - Diagnose von *Rubus stunt* Phytoplasmen mittels Multiplex TaqMan qPCR

Diagnosis of Rubus stunt Phytoplasmas by Multiplex TaqMan qPCR

Holger Linck, Erika Krüger, Annette Reineke

Hochschule Geisenheim University, Institut für Phytomedizin, holger.linck@hs-gm.de, holger@npw.net

Die Phytoplasmosen *Rubus stunt* sind eine ökonomisch wichtige Krankheit an Himbeeren (*Rubus idaeus* L.), Brombeeren (*Rubus fruticosus* L.), und Loganbeeren (*Rubus x loganobaccus*). Phytoplasmen, die Erreger der *Rubus stunt*, sind kleine, zellwandfreie Bakterien, die als obligate Parasiten das Phloem ihrer Wirtspflanzen besiedeln und von phloemsaugenden Insekten übertragen werden können (Weintraub & Beanland, 2006). Zu den Symptomen gehören unter anderem ein gestauchter Wuchs (Hexenbesenwuchs), Durchwuchs der Früchte mit Blüthen, verkleinerte Blätter, kurze Internodien, verlängerte Kelchblätter und deformierte Früchte (Mäurer & Seemüller, 1994). Da die Inkubationszeit bis zu 11 Monaten betragen kann (Fluiter & Meer, 1953) und *Rubus*-Arten vegetativ vermehrt werden, ist eine frühe Diagnose infizierter Pflanzen mit schnellen molekularen Methoden äußerst wichtig, um die Verbreitung infizierter Pflanzen zu verhindern. Die am häufigsten eingesetzte Methode um Phytoplasmen in Pflanzen nachzuweisen, ist eine arbeitszeitintensive nested PCR (Delić, 2012), da eine Standard-PCR aufgrund der niedrigen Konzentrationen an Phytoplasmen in infizierten Organismen meist nicht sensitiv genug für einen Nachweis ist (Jarusch et al., 2001). Zusätzlich ist wenig über die Verteilung von Phytoplasmen in unterschiedlichen Organen von *Rubus*-Pflanzen und dem Spektrum an Vektorinsekten bekannt. Als Folge dessen gibt es im Moment keine verfügbaren Managementstrategien für *Rubus stunt*. Daher wurden zum Screening von *Rubus stunt* schnelle und zuverlässige Multiplex TaqMan qPCR Assays entwickelt und zur Diagnose von Phytoplasmen in Himbeerpflanzen und potentiellen Vektorinsekten eingesetzt.

Literatur

- Delić, D. 2012: Polymerase Chain Reaction for Phytoplasmas Detection. In: Polymerase Chain Reaction. Hernandez-Rodriguez, P. InTech; 91 – 118.
- Fluiter, H.J., F.A. Meer, 1953: *Rubus stunt*, a leafhopper-borne virusdisease. Tijdschr Over Plantenziekten. 59, 195–197.
- Jarusch, W., B. Jarusch-Wehrheim, J.L. Danet, J.M. Broquaire, F. Dosba, C. Saillard, M. Garnier, 2001: Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. Eur J Plant Pathol. 107, 209–217.
- Mäurer, R., E. Seemüller, 1994: Nature and genetic relatedness of the mycoplasma-like organism causing *Rubus stunt* in Europe. Plant Pathol. 44, 244–249.
- Weintraub, P.G., L. Beanland, 2006: Insect vectors of phytoplasmas. Annu Rev Entomol. 51, 91–111.

30-2 - Elektronenmikroskopischer und serologischer Nachweis von Pflanzenviren in Hülsenfrüchten

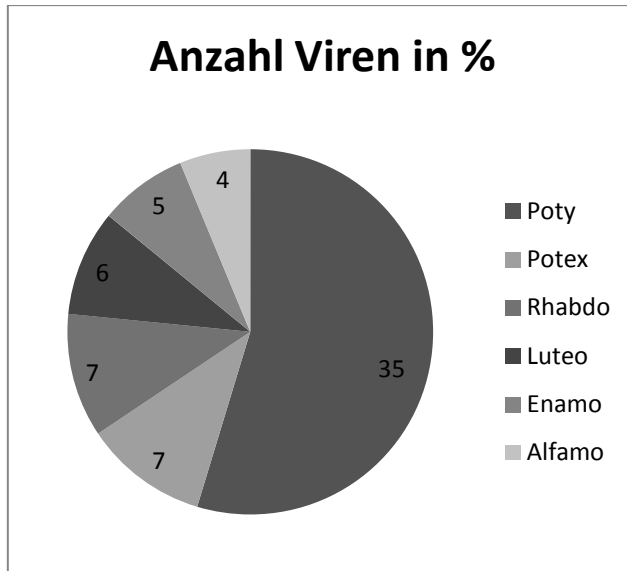
Katja Richert-Pöggeler, Heiko Ziebell, Vetten, Christina Maaß, Sabine Schuhmann, Thomas Kühne

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, katja.richert-poeggeler@julius-kuehn.de

Pflanzen aus der Familie *Fabaceae* (Synonyme: Leguminosen, Hülsenfrüchte) haben aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften und Verwendbarkeit in den letzten Jahren vermehrt an Aufmerksamkeit gewonnen. Neben ihren Vorteilen für die Bodenfruchtbarkeit basierend auf der symbiotischen Stickstoff-Fixierung stellen die einheimischen Körnerleguminosen eine attraktive Alternative zu den auf Soja-basierenden proteinhaltigen Nahrungs- bzw. Futtermitteln dar. Das von der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) für 2016 ausgerufene Internationale Jahr der Hülsenfrüchte möchte u. a. die Aufmerksamkeit auf die Kulturmethoden und globalen Handelswege sowie auf die für den Menschen ernährungsphysiologisch bedeutsamen Inhaltsstoffe dieser Pflanzenfamilie lenken. Viruserkrankungen können bei Pflanzen zu bedeutenden Ertragsverlusten führen. Wir konnten in unseren Untersuchungen nicht nur umfassende Informationen zur Virusvielfalt, globalen Virusverbreitung und Wirtspflanzendiversität innerhalb der *Fabaceae* gewinnen, sondern auch geeignete Verfahren zur Diagnose testen.

In Probeneinsendungen von landwirtschaftlichen sowie gärtnerischen Kulturpflanzen des Zeitraums 2007 bis 2011, die zum größten Teil aus Deutschland und Österreich, sowie aus Ungarn, Schweden und Serbien stammten, wurden Pflanzenviren mit isometrischen, fadenförmigen oder membranumhüllten Virionen nachgewiesen und serologisch identifiziert. Überwiegend handelte es sich um Infektionen mit einzelnen Viren, doch auch Mischinfektionen mit Viren aus derselben oder aus unterschiedlichen Virusgattungen und -familien konnten in Pflanzen nachgewiesen werden. *Pisum sativum* zeigte das breiteste Virusspektrum, das 12 verschiedene Viren aus 7 unterschiedlichen Gattungen umfasste.

Die Graphik fasst die Verteilung der nachgewiesenen Virusgattungen zusammen, die in mindestens 5 Proben vorkamen. Blaue Farben markieren fadenförmige Viren, rote Farben kennzeichnen isometrische-bazilliforme Viren und gelb steht für membranumhüllte Viren:



30-3 - Einblicke in die Zukunft: Cloud computing – eine Antwort auf das Schwinden taxonomischer Expertise am Beispiel der Fransenflügler (Thysanoptera)

Communication with the future: Cloud computing – a response to diminishing taxonomic expertise in the taxon thrips (Thysanoptera)

Gerald Moritz¹⁾, Stephanie Krüger¹⁾, Julia Chuttke¹⁾, Sevgan Subramanian²⁾, Laurence Mound³⁾

¹⁾Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, gerald.moritz@zoologie.uni-halle.de

²⁾Plant Health Division, *icipe*, Nairobi, Kenya

³⁾CSIRO, Australian National Insect Collection, Canberra, Australia

Über 6000 Thrips-Arten sind weltweit beschrieben, davon weniger als 100 phytomedizinisch relevant und ca. 10 Arten als Virusvektoren bekannt. Ihr Schaden kann enorm und ihre Bekämpfung vor allem durch Insektizid-Resistenzen aussichtslos sein. Die exakte Identifikation ist bei Schadthysanopteren kompliziert und oftmals ohne diagnostisches Expertenwissen nicht möglich, welches jedoch in unserer modernen Wissenschaftslandschaft mehr und mehr ausstirbt. Die vorhandene Literatur ist in die Jahre gekommen und lokal orientiert. Zudem haben sich im modernen Pflanzenschutz die Anforderungen verändert. Vermehrung, Anzucht und Kultur von Pflanzen erstrecken sich oftmals über Kontinente, invasive Arten sind entsprechend die Folge, wodurch ein völlig neues Schaderregerinventar auftreten kann.

Schnelle und exakte Identifikationen liefern den Schlüssel zum Verständnis der Biologie, Reproduktion und Verbreitung, aber auch für mögliche Kontrollmaßnahmen einer Schadspezies. Jedoch sind gezielte IPM-Maßnahmen aufgrund qualitativ-limitierter Pest-Management-Instruktionen, Zeitdruck sowie Experten- und Personalmangel kaum noch möglich. Parallel zu dieser Entwicklung verändern sich mediale Informationswelten und

substituieren herkömmliche Datenträger (Disk, CD, DVD) zwangsweise allein auf der Basis notwendiger Sicherheits-Updates.

Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Softwaretools zu Informations- und multivariate Identifikationstechnologien^{*)} entwickelt, die via Cloud genutzt und unabhängig vom OS (Win, Mac, Linux) zur visuellen Identifikation adulter Stadien dienen. Zudem stehen für Embryonal-, Larval- und Metamorphosestadien online-Servicetools basierend auf ITS-RFLP-Analysen zur Verfügung^{**)}. Jede Identifizierung führt zu einem „Fact Sheet“, das Daten zur Biologie, zur geographischen Verbreitung, zu Wirtspflanzen, Vektoreigenschaften sowie mikroskopische Originalaufnahmen beinhaltet. Die Präsentation gibt eine beispielhafte Übersicht über Möglichkeiten und Nutzung des Lucid-Key-Server^{***)} einschließlich LucID-Mobile^{****)} zur Identifikation und Bewertung eines bestehenden Thrips-Befalls.

Links

*) Newsletter Lucidcentral.org (<http://www.lucidcentral.org/mail/2016/march/>)

***) Lucid Key Server und ITS RFLP (<http://www.dev-biol.uni-halle.de/>)

****) LucID Mobile (<https://play.google.com/store/apps/details?id=com.lucidcentral.mobile.ptea&hl=de>)

Literatur

ThripsWiki (2016) - providing information on the World's thrips. (http://thrips.info/wiki/Main_Page)

30-5 - Feldnachweis von Soilborn cereal mosaic virus in verschiedenen Getreidearten

Evidence of Soilborn cereal mosaic virus on different cereals in field

Volker Zahn, Felix Haarstrich

Landwirtschaftskammer Niedersachsen, volker.zahn@lwk-niedersachsen.de

In einem dreijährigen Versuch auf einer mit Soilborn cereal mosaic virus (SCMV) befallenen Fläche wurden verschiedene Getreidearten ausgesät und mit unterschiedlichsten Düngevarianten und Beizungen behandelt. Im Herbst 2013 wurden die Getreidearten Winterroggen, Winterweizen, Wintergerste und Wintertriticale in verschiedenen Sorten auf einer SCMV-infizierten Fläche ausgesät und die Infektionshäufigkeit sowie der Ertrag überprüft. Gleichzeitig wurde die Winterroggensorte Visello in 5 unterschiedlichen Varianten zusätzlich mit verschiedenen Kombinationen von Systiva, Kalkstickstoff, Nutriseed, Epsos, und Mangan behandelt. Es hat sich gezeigt, dass keine der eingesetzten Dünge- oder Beizvarianten zu einer Verringerung der Infektion im Vergleich zur Kontrolle geführt hat. Bei den verschiedenen Getreidesorten gab es graduelle Unterschiede bei der Infektionshöhe, es wurden aber alle Getreidearten befallen, wenn auch in unterschiedlicher Stärke. Eine Beerntung zum Ende des Versuches ergab keine signifikanten Ertragsunterschiede sowohl zwischen den Getreidesorten, den Getreidearten und den Dünge- und Beizvarianten.

Dieser Versuch wurde im Jahre 2015 nochmals wiederholt, allerdings wurden dabei die Dünge- und Beizvarianten weg gelassen und der Fokus auf die verschiedenen Getreidesorten gelegt. Ausgesät wurden dabei wieder verschiedene Sorten der Getreidearten Winterroggen, Wintertriticale, Winterweizen und Wintergerste. Zusätzlich wurde im Frühjahr in einem kleineren Umfang noch die Sommerungen Sommertriticale, Sommerhafer, Sommergerste und Mais auf die infizierte Fläche ausgesät. In der späteren Untersuchung der Getreidearten zeigte sich wiederum, dass alle Wintergetreidearten von dem Virus befallen wurden. Die als resistent eingestuft Winterweizensorten Rebell und

Pilgrim wurden zwar befallen aber nur auf einem sehr niedrigen Niveau. Allerdings war der Ertrag dieser Sorten nicht so hoch wie bei den nicht resistenten Sorten. Alle Sommergetreidearten blieben dagegen ohne Infektion. Bei den durch die Beerntung erzielten Ertragswerten, ergaben sich bis auf die resistenten Sorten wiederum keine signifikanten Unterschiede. Die Sommerungen konnten nicht beerntet werden, da diese von der Parzellengröße nicht den anderen Parzellen entsprachen.

Im Jahr 2016 wurden zwei weitere Versuche an zwei Standorten angelegt, bei denen nur Sommergerste, Sommertriticale, Sommerhafer, Sommerweizen, Sommerroggen und Mais im Frühjahr in die mit SCMV infizierte Flächen gesät wurden. Es zeigte sich, dass alle Sommergetreidearten nicht von SCMV infiziert wurden, obwohl der um die Versuchspartzellen ausgesäte Winterroggen stark befallen war. Gleichzeitig wurden im Frühjahr 2016 Gewächshausversuche mit infizierter Erde aus den Versuchsfeldern angelegt. Dazu wurde in die Erde sowohl Winterweizen, Winterroggen und verschiedene Gräsermischungen eingesät und in regelmäßigen Abständen untersucht. Es konnten auch bei diesen Versuchen keine Infektionen nachgewiesen werden. Ob ein fehlender Kältereiz im Winter zu diesem Effekt führt, kann nicht belegt werden. Dieser Frage soll aber in einem weiteren Versuch im Jahre 2017 nachgegangen werden.

Literatur

Kastirr, U. Wortmann, H. Ehrig, F. 2006: Untersuchungen zum Infektionsverlauf und zur biologischen Differenzierung von bodenbürtigen Viren im Roggen, Triticale und Weizen. *Gesunde Pflanze* 58, 231-238.

Rabenstein, F. Fomitcheva, V. Kühne, T. 2011: Viren in der Wintergerste – wird die Produktion in Deutschland durch ein weiteres bodenbürtiges Virus bedroht? *Journal für Kulturpflanzen* 63(3), 83 – 89.

30-6 - Real-time PCR-basierte Quantifizierung von *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IIIB) aus Bodenextrakten und Untersuchungen verschiedener Faktoren wie Sortenwahl und Fungizideinsatz auf die Erregerkonzentration in Feldeböden

*Real-time PCR-based quantification of *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IIIB) in soil extracts and the effect of different factors like plant cultivar and fungicide treatment on pathogen concentration in field soils*

Anika Bartholomäus¹, Sascha Schulze¹, Stefan Mittler², Heinz-Josef Koch¹, Bernward Märländer¹, Mark Varrelmann¹

¹Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ), Holtenser Landstraße 77, 37.79 Göttingen, bartholomaeus@ifz-goettingen.de ²Syngenta Agro GmbH, Am Technologiepark 1-5, 63477 Maintal

Rhizoctonia solani (anastomosis group 2-2 IIIB) is the causal agent of Rhizoctonia root and crown rot, a soil-borne disease that causes severe economic losses in sugar beet cultivation world-wide. Previous real-time PCR-based quantification methods rely either on very small soil volumes or are very time-consuming due to baiting steps prior to DNA extraction.

Here, a direct soil DNA extraction method was applied for detection of *R. solani* from samples of 250 g soil using a newly developed real-time PCR assay. The assay is specific to the AG 2-2 IIIB and standard curves originated from three different field soils spiked with sclerotia gave evidence of its valid quantification with a detection limit of 2 mg sclerotia per kg soil.

Different independent field trials with artificial inoculation were conducted to study the effect of plant cultivar, crop rotation and fungicide treatment on the pathogen concentration in the soil. The results showed that the amount of quantified DNA in the soil at harvest correlated with the rated disease severity of Rhizoctonia root and crown rot. Additionally, a strong effect of the sugar beet genotype was observed. At harvest, the

amount of *Rhizoctonia* DNA was significantly increased in plots cultivated with a susceptible sugar beet genotype compared to a resistant one. The results also indicate, that depending on the initial inoculum, the effect of the resistant genotype varies, keeping it on a steady level at a lower disease pressure, but tend to propagate the inoculum if the disease pressure was high. The application of fungicides significantly reduced the pathogen concentration in the soil, as well as the cultivation of the non-hosts winter rye, which was shown in a second field trial. This fast and reliable quantification method represents an applicable tool to study the long-term development of the pathogen concentration in soils in the future and is the first step towards a disease prediction model. Nevertheless, further research is necessary for the validation of this assay, especially in regard to the analysis of naturally infected soil.

30-7 - Anwendung einer Real-time PCR zum Nachweis von TMV und PepMV in Nährlösung

Application of a real time PCR system for the detection of TMV and PepMV in nutrient solution

Maria Landgraf¹, Stellan Zytur¹, Hans-Marlon Rodriguez^{1,2}, Martina Bandte¹, Carmen Büttner¹

¹Humboldt Universität zu Berlin, maria.landgraf@agrar.hu-berlin.de

²Francisco de Paula Santander University, Agricultural Sciences Faculty, San José de Cúcuta, Kolumbien

Krankheitserreger können sehr leicht mit dem Wasser übertragen werden. Sie stellen eine Gefahr bei der Wiederverwendung von Wasser in hydroponischen Systemen in Landwirtschaft und Gartenbau dar. So steigt das Risiko einer Infektion mit bodenbürtigen bzw. die Wurzel infizierenden Erregern bei der Rückführung von Beregnungswasser und Nährlösung. Die Abschätzung eines solchen Risikos kann ausschließlich auf Grundlage der a) Erregerkonzentration in der Nährlösung und/oder b) Anzahl der infizierten Pflanzen in der Produktionsanlage erfolgen. In Abhängigkeit von der Epidemiologie des Krankheitserregers muss eine Verbreitung des Erregers durch Vektoren, oder mechanisch bei Pflege- und Erntearbeiten berücksichtigt werden. Insbesondere bei Viren gibt es keine wirksamen Bekämpfungsmaßnahmen aber ein großes Zerstörungspotential. Für den spezifischen Nachweis der beiden stabilen viralen Krankheitserreger *Pepino mosaic virus* (PepMV) und *Tobacco mosaic virus* (TMV) wurde eine Sonden basierte qPCR etabliert. Der quantitative Nachweis der Erreger sowohl in Pflanzenmaterial als auch in der Nährlösung wird ermöglicht und damit die Risikobewertung sehr erleichtert. Die Etablierung der qPCR Systeme erfolgte auf der Grundlage der Arbeiten von Ling et al. 2007 für PepMV und Jacobi et al. 1998 für TMV. Die genutzten Oligonukleotide wurden, um zusätzliche Primer und TaqMan-Sonden erweitert. Da in Nährlösung keine kontinuierlich nachweisbaren Organismen vorhanden sein sollten, wurden zur Identifizierung von Matrix-Inhibitionen in der PCR mittels PCR Mutagenese zwei artifizielle qPCR Systeme etabliert. Die Qualität der Nährlösung kann nun im Hinblick auf eine Kontamination mit den beiden Viren ermittelt und Maßnahmen zur Desinfektion der Nährlösung bewertet werden. Es werden die beiden qPCR Systeme vorgestellt und Untersuchungen zum Nachweis der Erreger aus Nährlösung, wie sie während der Kultivierung von Tomaten in hydroponischen Kultursystemen verwendet wird, gezeigt.

Literatur

Bandte M., M. H. Rodriguez, I. Schuch, U. Schmidt, C. Buettner, 2016: Plant viruses in irrigation water: reduced dispersal of viruses using sensor-based disinfection. *Irrig Sci*, 34:221–229. DOI 10.1007/s00271-016-0500-1m
Literaturverzeichnis stehen die Referenzen nach den Autorennamen alphabetisch sortiert, wobei die Reihenfolge von Initialen und Nachnamen zu beachten ist (siehe Beispiel unten). Die allgemeine Reihenfolge der Zitation ist:

- Jacobi V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin, J.D. Castello, 1998: Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. *Journal of Virological Methods* 74, 167–178.
- Ling K.-S., W. P. Wechter, R. Jordan, 2007: Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of Pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 144, 65–72.
- Schwarz D., U. Beuch, M. Bandte, A. Fakhro, C. Büttner, C. Obermeier, 2010: Spread and interaction of Pepino mosaic virus (PepMV) and *Pythium aphanidermatum* in a closed nutrient solution recirculation system: effects on tomato growth and yield. *Plant Pathology*, 59, 443-452.
- Wei C., L. Wenting, J. Honghong, Z. Huawei, C. Julong, W. Yunfeng, 2014: Development of a concentration method for detection of tobacco mosaic virus in irrigation water. *Virologica Sinica*, 29 (3): 155-161. DOI 10.1007/s12250-014-3461-7
- Yang J.-G., F.-L. Wang, D.-X. Chen, L.-L. Shen, Y.-M. Qian, Z.-Y. Liang, W.-C. Zhou, T.-H. Yan, 2012: Development of a One-Step Immunocapture Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Tobacco Mosaic Virus in Soil. *Sensors*, 12, 16685-16694; doi:10.3390/s121216685

30-8 - Differentiation of German field populations of the sugar beet cyst nematode based on a pathogenicity gene

Rasha Haj Nuaima, Johannes Roeb, Johannes Hallmann, Matthias Daub, Sandra Fischer, Holger Heuer

Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, rasha.haj-nuaima@julius-kuehn.de

An improved investigation of intra- and interpopulation genetic variation is required to follow the epidemiology of the important sugar beet parasitic cyst nematode *Heterodera schachtii*, and design an effective control management with respect to specific properties of local populations.

The venom allergen like protein gene, *vap1*, is an essential pathogenicity gene of *H. schachtii* which is expressed during the initial period of root penetration and migration. The secreted effector protein interacts with the immunity system of the host plant and thus is probably under strong selective pressure, so that the *vap1* gene is expected to exhibit high genetic variation among populations of *H. schachtii*.

In our study we aimed to develop and apply the genetic fingerprinting technique PCR-DGGE to resolve gene variants of *vap1*. From each individual of *H. schachtii* up to six variants of the gene were amplified by PCR which differed in DNA sequence and appeared as separate bands in DGGE. PCR-DGGE fingerprints from multiple cysts from a field reflected the relative distribution of *vap1* variants in the population. Populations from distant fields significantly differed in *vap1* fingerprints. The genetic composition of *H. schachtii* population from different regions in Germany at various spatial scales are currently compared. Conclusions of our results with respect to spread of populations and selection of *vap1* gene variants will be discussed.