

## **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 10<sup>2</sup> und 10 Zellen je Milliliter. Bei der Reisolierung, 4 Wochen nach Inokulation, war CMS aus den Testpflanzen mit einer Inokulationskonzentration ab 10<sup>3</sup> 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