

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 Reisolation, 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 veranlagt zeigten 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 Probenahme, etabliert. Mit dieser Linie konnte außerdem die Lokalisierung und die Migration in den Geweben und die potenziellen Infektionsmöglichkeiten während des Veredelungsprozesses untersucht werden.