

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 justiziablen 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*).

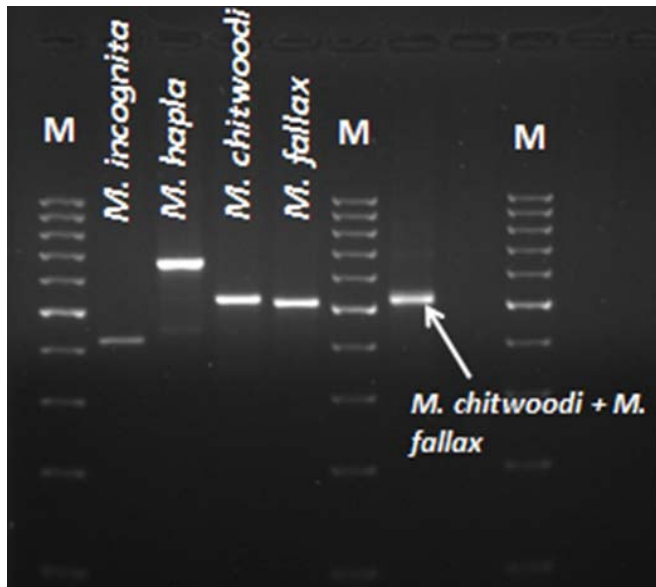


Abb. 1 Bandenmuster der amplifizierten Sequenzen (Primer H18S, CF-ITS, I-ITS, HCFI-28S), M: Marker 100 bp Ladder (Fermentas)

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.