

In dem vorgestellten Assay wurde mittels Protein A die Goldfläche des SPR-Chips mit homologem polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen das *Potato virus X* (PVX) funktionalisiert und Presssaft von PVX- infizierten Pflanzen mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 µl/s über den Chip gespült. Ein deutliches Signal war auf den Flächen messbar, welche mit homologem Antikörper funktionalisiert worden waren. Auf den Referenzflächen, auf welchen heterologe Antikörper immobilisiert wurden, konnte keine oder nur eine geringe Signalerhöhung gemessen werden. Die Empfindlichkeit des Nachweises konnte durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers noch erhöht werden. Hierbei wurde zunächst der virushaltige Pflanzen- Presssaft über den Chip gespült. Anschließend wurde ein weiterer spezifischer Antikörper über den Chip gespült, der seinerseits an die gebundenen Viruspartikel bindet. Dadurch konnte die Schichtdicke weiter erhöht und so die Empfindlichkeit gesteigert werden. Am Beispiel des PVX wurde so ein Nachweissystem optimiert, mit dem das Virus in Presssaft infizierter Pflanzen innerhalb 2 h nachgewiesen werden kann.

33-4 - Pastrik, K.-H.¹⁾; Steinbach, P.²⁾

¹⁾ Landwirtschaftskammer Niedersachsen

²⁾ Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 1: Entwicklung und Validierung der qPCR als Knollentest

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases, Part 1: Development and validation of a qPCR-method for tubertesting.

In der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten bei Pflanzkartoffeln wird gegenwärtig der ELISA-Test als Standardverfahren angewendet. Dabei wird ein Nachweis aus dem Blatt von Augenstecklingen bzw. aus Knollenkeimen geführt, da die zu testenden Viren zunächst angereichert werden müssen. Ein sicherer Nachweis der Viren direkt aus den Kartoffelknollen ist aufgrund der zu geringen Nachweisempfindlichkeit des ELISA-Tests nicht möglich. Die Prüfungsdauer je Kartoffelprobe (100 Knollen) beträgt bei diesem Verfahren ca. 6 bis 7 Wochen. Um die Konkurrenzfähigkeit der deutschen Pflanzgutproduktion zu gewährleisten, ist eine Verkürzung der Testdauer bei Export-Proben anzustreben.

Durch die Anwendung sensitiverer Nachweismethoden wie z. B. der quantitativen PCR (qPCR) kann eine Verkürzung der Testdauer erreicht werden. Im Pflanzenschutzamt Hannover wurde in Zusammenarbeit mit der Virusprüfung-Gülsow (LALLF, Mecklenburg/Vorpommern) ein qPCR-Test entwickelt, der die Untersuchung auf die wesentlichen Kartoffelviren PVY, PLRV und PVS direkt aus der Kartoffelknolle umfasst. Im Unterschied zum ELISA-Standardverfahren wird beim qPCR-Test die Kartoffelprobe in Probenpools zu 10 x 10 Knollen untersucht. Der qPCR-Test umfasst zwei unterschiedliche Multiplex-qPCR-Untersuchungen. In der einen Multiplex-Reaktion wird auf die Viren PVY und PLRV getestet, in der anderen erfolgt ein Nachweis von PVS bei gleichzeitiger Amplifikation einer internen PCR-Kontrolle (Cox).

In Pilotuntersuchungen wurde die Richtigkeit der qPCR-Ergebnisse validiert. Dazu wurden 26 Routine-Kartoffelproben aus der Beschaffenheitsprüfung von Pflanzkartoffeln sowohl mit dem ELISA-Standardverfahren als auch mit dem entwickelten qPCR-Test untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte eine hohe Übereinstimmung beider Verfahren trotz der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte. Weiterhin konnte durch den Einsatz der qPCR eine starke Verkürzung der Testdauer erreicht werden.

33-5 - Steinbach, P.¹⁾; Pastrik, K.-H.²⁾

¹⁾ Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

²⁾ Landwirtschaftskammer Niedersachsen

Nachweisverfahren in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten der Kartoffel, Teil 2: Vergleichsuntersuchungen zu ELISA-Standardverfahren und q-PCR

Detection methods in post harvest official testing of seed potatoes for viral diseases

Part 2: Comparison study for ELISA methods and qPCR

Gemäß Pflanzkartoffelverordnung (PflKartV) wird in der Beschaffenheitsprüfung auf Viruskrankheiten als Bestandteil des Anerkennungsverfahrens von Pflanzkartoffeln der Besatz mit den Kartoffelviren PLRV, PVY, PVA, PVM, PVX und PVS ermittelt. Das erfolgt bundesweit einheitlich mittels Labortestung im ELISA-Verfahren (Standardverfahren) an Augenstecklingspflanzen bzw. vereinzelt an Knollenkeimen (Ausnahme: Z-Pflanzgut kann durch visuelle Symptomfeststellung zertifiziert werden). Infolge der Anzucht von Augenstecklingspflanzen

im Gewächshaus und der anschließenden Laboruntersuchung beträgt die Untersuchungsdauer ca. 6 bis 7 Wochen. Der Virusnachweis direkt an der Knolle könnte demgegenüber eine Zeitersparnis bedeuten.

Von 2008 bis 2010 wurde das Verfahren ELISA an der Knolle nach Behandlung mit Rindite (Gugerli, 1979) gegenüber dem Standardverfahren hinsichtlich der Nachweissicherheit für PLRV, PVY, PVM und PVS an 47 offiziellen Pflanzkartoffelpartien a 112 Knollen je Probe vergleichend geprüft. Außerdem erfolgten in den Jahren 2010 und 2011 an 7 Proben a 100 Knollen vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von PLRV, PVY und PVS zwischen den ELISA-Testverfahren und dem für die schnellere Ergebnisbereitstellung bei Exportproben entwickelten qPCR-Verfahren.

Bei den geprüften ELISA-Methoden konnte das derzeit in Europa bedeutendste Kartoffelvirus PVY aus Knollensaft in Keimnähe häufiger und sicherer nachgewiesen werden als im Blattsaft beim Standardverfahren der Augenstecklingsprüfung. Der Nachweis von PLRV und PVM gelang in beiden ELISA-Testverfahren gleichwertig gut. Durch den Knollentest konnte die Prüfungsdauer um bis zu 14 Tage verkürzt werden.

Das entwickelte qPCR-Verfahren zeigte für PLRV, PVY und PVS trotz deutlich früherem Testtermin und Pooluntersuchung eine sehr hohe Nachweissicherheit. Es lag eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Poolergebnisse mit den im ELISA festgestellten Kartoffelviren vor.

Abschließend werden die Anwendungsmöglichkeiten der geprüften Knollenteste in der Beschaffenheitsprüfung im Rahmen der Anerkennung von Pflanzkartoffeln diskutiert.

33-6 - Stammler, G.¹⁾; Miessner, S.¹⁾; Schutte, T.²⁾

¹⁾ BASF SE

²⁾ Citrus Research International, South Africa

Phyllosticta-species on Citrus: Species differentiation and sensitivity to QoI fungicides

Citrus black spot, caused by *Phyllosticta citricarpa*, is responsible for substantial losses in citrus in Africa, Asia, America and Australia, affecting all citrus cultivars. According to recent publications several *Phyllosticta* species are known to occur on citrus, which include *P. citricarpa*, *P. citriasiana*, *P. capitalensis*, *P. citribraziliensis* and *P. citrichinaensis* (1). Only *P. citricarpa* and *P. citriasiana* have been proved to be pathogenic, while others are non-pathogenic endophytes on citrus. *P. citricarpa* is the most important pathogen, while *P. citriasiana* has so far only been found on *Citrus maxima* in Asia (2). *P. capitalensis* is a species which is often isolated from citrus fruits, but represents an endophytic, non-pathogenic species on citrus. The aim of the present study was to identify the risk of the three most important species, *P. citricarpa*, *P. citriasiana* and *P. capitalensis*, to become resistant to QoIs. Strains were isolated from different Citrus hosts and identified by morphological and molecular genetic characteristics (4) followed by a comparison with reference isolates from the CBS, Utrecht. The analyses showed a high intraspecific homogeneity but interspecific differences.

All isolates of *P. citricarpa* and *P. citriasiana* were highly sensitive in microtiter tests to the QoI pyraclostrobin, more sensitive than isolates of *P. capitalensis*. EC₅₀ values of field isolates were in narrow ranges and comparable to the corresponding reference isolates within the three different species, which indicates that an adaptation to QoIs has not yet occurred. Analysis of the target gene of QoIs, the cytochrome *b*, revealed that no isolate had amino acid exchanges at positions which are known to reduce QoI sensitivity (codons 129, 137, 143). Additionally, an intron sequence directly after the codon 143 is present in all isolates of *P. citricarpa*. Based on the experiences with other "intron-pathogens" (e.g. *Pyrenophora teres*, *Monilinia laxa*) the occurrence of the G143A mutation, the mutation with highest impact on QoI sensitivity, is rather unlikely (4). Such an intron could not be found for *P. citriasiana* and *P. capitalensis*, which means that the G143A mutation could be expected after high selection pressure as it has been found in other plant pathogens. As precautionary measurements, resistance management strategies should be followed also for *P. citricarpa* especially by limitation of QoI applications, alternation of fungicides with different modes of action and/or by using efficacious mixing partners. This is even more important in regions and farms in Asia where *P. citriasiana* could be found.

The *Phyllosticta* complex is still under investigation, and recent studies led to several new species descriptions. Our studies showed that the cytochrome *b* gene is a valuable tool for species differentiation and identification. One advantage of this gene is its repetitiveness, since it is part of the mitochondrial DNA (mtDNA). This repetitiveness reduces the detection limit, which is favorable for development of reliable PCR assays. Previous studies have shown that mtDNA is appropriate for species and subspecies identification in various fungal genera (5). In particular the intron sequences associated with the cytochrome *b* gene in *Phyllosticta* provide interesting approaches for identification, differentiation and detection of *Phyllosticta* species. Since identification and differentiation of non-pathogenic and pathogenic *Phyllosticta* species on citrus fruits for EU import is important for a reliable detection of the pathogenic quarantine organisms, the findings of this study can also be helpful in developing efficient diagnostic tools for phytosanitary purposes. Our PCR assay provided an accurate differentia-