

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen	Förderkennzeichen: 2811ERA003
Vorhabensbezeichnung:	Erfassung von Faktoren und Determinanten, die im Zusammenhang mit der Verbreitung, der Bedeutung und dem Nachweis von Kern- und Steinobstphytoplasmen in der Europäischen Gemeinschaft stehen.
Laufzeit des Vorhabens:	01.11.2012 – 31.10.2014
Berichtszeitraum:	01.01.2014 – 31.10.2014

Zusammenfassung

Das ERA-Net EUPHRESKO Projekt "APOPHYT" hatte die Zielsetzung, die Krankheitsentwicklung phytoplasma-infizierten Kern- und Steinobsts, sowie deren latente Verbreitung in Vermehrungsbetrieben zu untersuchen. Eine Nachweismethode (LAMP) sollte etabliert werden, um die Diagnose zu vereinfachen und zu beschleunigen. Nach Abschluss des Projekts werden die Ergebnisse den Pflanzenschutzdiensten und relevanten Behörden zur effizienteren Kontrolle der Krankheiten mitgeteilt. Die Phytoplasmosen, Apfeltriebsucht, Birnenverfall und die Europäische Steinobstvergilbung sind in Deutschland, Österreich und Italien seit Langem beschrieben und ihre Verbreitung gut untersucht. In den Partnerländern Belgien und Norwegen war dies zu Beginn des Projekts nicht der Fall. Umfangreiche Untersuchungen zeigten, dass die Apfeltriebsucht und der Birnenverfall in belgischen Erwerbsbetrieben und Kleingärten weit verbreitet sind. In Norwegen waren in einzelnen Anlagen bis zu 25% der Bäume mit Apfeltriebsucht infiziert. Hohe Infektionsraten wurden auch in tschechischen Birnenvermehrungsbetrieben und in Österreich in ökologisch betriebenen Birnenreisnerschnittanlagen festgestellt. In der Schweiz sind Aprikosenanlagen in erheblichem Ausmaß mit der Europäischen Steinobstvergilbung durchseucht, die den Anbau im Wallis stark beeinträchtigen. Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass Phytoplasmosen eine größere Bedeutung zukommt als bisher angenommen und dass von einer weiteren Ausbreitung der Krankheiten ausgegangen werden muss.

1. Einleitung

Phytoplasmaerkrankungen von Kern- und Steinobst führen in Europa zu bedeutenden wirtschaftlichen Schäden. Während die Apfeltriebsucht (AP) in Süddeutschland, Österreich, Norditalien und den angrenzenden Gebieten bisher die größten Schäden verursachte, melden auch Regionen in Nordeuropa eine ansteigende Bedeutung der Krankheit. Der Birnenverfall (PD) ist in ganz Europa von Bedeutung und insbesondere Junganlagen und Streuobst sind betroffen. Die Europäische Steinobstvergilbung (ESFY) ist ebenfalls weit verbreitet, aber größere Schäden treten nur im Aprikosenanbau und bei empfindlichen Pflirsichsorten auf. Das Infektionspotential der Erreger ist erheblich, da aufgelassene Obstanlagen, Streuobstwiesen, Kleingärten und Hecken mit infizierten Bäumen überall verbreitet sind. Eine Vermeidung von Infektionen in Erwerbsbetrieben ist unter diesen Bedingungen auf Dauer unmöglich. Die zunehmend geringer werdende Anzahl einsetzbarer Insektizide zur Bekämpfung der Psylliden, verschärft die Situation zusätzlich. Während die Schädigung in Erwerbsanlagen bedeutend sein kann, ist eine Infektion in Reisnerschnittgärten und Unterlagenvermehrungsbetrieben wegen der Quarantänerichtlinien existenzbedrohend. Trotz ihrer weiten Verbreitung und Bedeutung ist wenig über diese bakteriellen Erkrankungen bekannt. Zum einen liegt dies an den bisweilen unspezifisch und zyklisch auftretenden Symptomen, zum anderen an der Schwierigkeit die Bakterien in verdächtigen Pflanzen eindeutig nachzuweisen. Bei Apfeltriebsucht und Birnenverfall handelt es sich um Quarantäneschaderreger, bei deren Auftreten eine Verkaufssperre und Rodungsanordnungen verhängt werden. Die vorgeschriebene visuelle Bonitur (Richtlinie 2000/29/EC) hat sich in Vermehrungsbetrieben, wie im Reisnerschnittgarten Weinsberg (Baden-Württemberg) und Magdeburg (Sachsen-Anhalt) ersichtlich, als unzureichend erwiesen. Da wenig über die Faktoren bekannt ist, die zur Ausbildung spezifischer Krankheitssymptome führen, hat das ERA-Net EUPHRESKO Projekt "APOPHYT" mit zweijähriger Laufzeit fünf Fragestellungen bearbeitet, in denen verschiedene Aspekte der Krankheitsentwicklung untersucht wurden. Die einzelnen Arbeitspakete sind unter Punkt 2 aufgeführt.

2. Ziele des internationalen und nationalen Projekts

Das EU Projekt ist in 5 wissenschaftliche und ein organisatorisches Arbeitspaket gegliedert. Arbeitspaket 2 (WP2) beinhaltet die Prüfung von Vermehrungsbetrieben auf ein latentes Vorkommen von Obstphytoplasmen. Im Arbeitspaket 3 (WP3) wurden die molekularen

Grundlagen der Virulenz verschiedener Apfeltriebsuchtherkünfte untersucht. Arbeitspaket 4 (WP4) umfasste die Beobachtung und das Monitoring einheitlich infizierter Pflanzen unter verschiedenen Umweltbedingungen in den Partnerländern. Arbeitspaket 5 (WP5) beschäftigte sich mit der Entwicklung und Verbesserung der Pathogendiagnostik durch das LAMP (loop-mediated isothermal amplification)-Verfahren. Arbeitspaket 6 (WP6) beinhaltete Arbeiten zu Phytoplasmavektoren sowie den Interaktionen zwischen Pflanze und Insekt. Die Arbeitspakete 2, 3, 4 und 5 waren Gegenstand des nationalen Projekts "Erfassung von Faktoren und Determinanten, die im Zusammenhang mit der Verbreitung, der Bedeutung und dem Nachweis von Kern- und Steinobstphytoplasmen in der Europäischen Gemeinschaft stehen".

3. Ergebnisse

3.1 Zusammenfassung der Vorjahresergebnisse

3.1.1. Ergebnisse des Berichtszeitraums 2012

- Bei der visuellen Kontrolle von 3000 Apfel-, 500 Birnen- und 79 Steinobstpflanzen aus den Vermehrungsbetrieben Ganther, Kimmig und dem Reiserschnittgarten (RSG) Weinsberg wurden keine spezifischen Phytoplasmasympptome entdeckt. Alle Steinobstproben aus dem RSG Weinsberg waren im PCR Tests phytoplasma-negativ.
- Aus der Apfeltriebsucht-Stammsammlung am Dossenheimer Institut wurden unterschiedliche Virulenztypen ausgewählt und die Zusammensetzung der Erregerpopulationen untersucht. Ein variables Genfragment wurde amplifiziert, kloniert und Unterschiede zwischen den AP-Typen durch SSCP Analyse ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass einige Pflanzen durch recht einheitliche aber auch komplexe Populationen besiedelt sind.
- Kern- und Steinobstunterlagen wurden mit definierten Phytoplasmaquellen infiziert und an die Projektpartner in Österreich, Italien, Norwegen, Belgien und der Tschechei zur weiteren Beobachtung unter den jeweiligen klimatischen Verhältnissen verschickt. In Dossenheim zeigten in 2012 nur die apfeltriebsucht-infizierten Pflanzen typische Symptome.

3.1.2. Ergebnisse des Berichtszeitraums 2013

- Im RSG Weinsberg wurden nach vorheriger Totalrodung wegen Phytoplasmabefalls im März 2013 Apfel- und Birnbäume neu aufgepflanzt. Alle Bäume (3000 Apfelbäume, 500 Birnbäume) wurden vor der Pflanzung auf Befall getestet. Drei Birnbäume aus dem Betrieb Kimmig erwiesen sich als phytoplasma-positiv. Im Oktober/November wurden im RSG je 100 Apfel-, Birnen- und Steinobstsprossproben gesammelt und auf Phytoplasmabefall untersucht. Keine der Pflanzen zeigte phytoplasma-spezifische Symptome und alle erwiesen sich als negativ im PCR Test.
- Die Zusammensetzung der AP-Phytoplasmapopulation und die Dynamik ihrer Entwicklung wurden an acht Akzessionen der Stammsammlung untersucht. Spross- und Wurzelproben wurden im Frühjahr, Sommer und Herbst entnommen und ein Fragment des Gens 464 PCR-amplifiziert. Die Fragmente wurden kloniert und in einer anschließenden SSCP Analyse, Spross und Wurzelklone untersucht. Sowohl im Spross wie auch in der Wurzel, waren im Jahresverlauf starke Veränderungen zu beobachten. Nur in wenigen Bäumen glichen sich die Profile aus Wurzel und Spross. Bis zu vier unterschiedliche Muster konnten in den Sprossen oder in Wurzeln unterschieden werden, wobei ein Muster in der Regel dominierte.
- M9, Kirchensaller und INRAII Unterlagen wurden 2012 und 2013 mit AP-, PD- und ESFY-infizierten Reisern veredelt. Pflanzenmaterial zur DNA Extraktion wurde im Frühjahr, Sommer und Herbst gesammelt. Die PD- und ESFY-infizierten Pflanzen waren nach der Infektion in einen schlechten Zustand, trotzdem war ein Pathogennachweis in den

meisten Pflanzen möglich. Der sicherste Nachweis gelang im Wurzelgewebe. Bei AP und PD-infizierten Pflanzen war der Nachweis auch im Spross und der Mittelrippe möglich, während in ESFY-infizierten Pflanzen nur gelegentlich Phytoplasmen in Mittelrippen nachgewiesen werden konnten. Alle AP-infizierten Bäume zeigten Hexenbesen. Die PD-infizierten Bäume waren rotlaubig und die ESFY-infizierten Aprikosen zeigten Blattrollsymptome.

3.1.3. Ergebnisse des Berichtszeitraums 2014 sowie abschließende Betrachtung

3.1.3.1. Untersuchungen von Muttergärten und Baumschulen zum Vorkommen latenter Infektion durch den Erreger der AP, PD und ESFY (WP2)

Im Reiserschnittgarten Weinsberg wurden am 01. Oktober 2014 Sprossproben von je 100 Apfel-, Birnen- und Steinobstbäumen gesammelt. Beim Kernobst handelt es sich um eine Auswahl der Pflanzen, die im März 2013 im Reiserschnittgarten Weinsberg neu aufgepflanzt wurden. Aus diesem Bestand wurden bereits im Vorjahr Proben entnommen. Bei den Aprikosen- und Pfirsichbäumen handelt es sich um Pflanzen im 6 – 10 Standjahr. Im Apfel- und Birnenquartier, ebenso wie im Steinobstbestand wurden keine spezifischen Phytoplasmasymptome entdeckt. Alle beprobten Sorten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Der Geschäftsführer Lothar Mayer hat keine phytoplasma-spezifischen Symptome in der Anlage beobachtet. In den PCR Assays wurden keine phytoplasma-positiven Proben gefunden.

3.1.3.2. Molekulare Bestimmung der Virulenz von AP Phytoplasmastämmen (WP3)

Acht AP-infizierte Bäume mit unterschiedlicher Symptomatik wurden aus der JKI Stammsammlung zur Untersuchung ausgewählt. Sieben der acht Isolate sind seit 1993 im Bestand und die auftretenden Krankheitssymptome wurden jährlich bonitiert (CDI). Die Stämme 1/93 und 8/93 zeigten in den vergangenen 20 Jahren keine ausgeprägten Symptome, während die Stämme 3/93, 6/93, 12/93 und 14/93 jedes Jahr deutliche Symptome zeigten. Der Stamm 10/93 zeigte einen milderen Krankheitsverlauf. Der Stamm 3/6 wurde erst später in die Untersuchungen aufgenommen und hat sich als stark virulent erwiesen. Die Symptomatik der Bäume glich in den Beobachtungsjahren 2013 und 2014 weitgehend der voriger Jahre, lediglich der Stamm 1/93 zeigte zum ersten Mal in 2013 einen Hexenbesen. In 2014 waren es bereits vier Hexenbesen. Einzelheiten zu den AP-Stämmen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Frühere Untersuchungen an stark und schwach virulenten AP-Typen haben eine Korrelation bestimmter Sequenzmotive von HflB und ATPase Genen mit der Virulenz ergeben. Ob diese Korrelation mittelbar oder unmittelbar ist, kann im Moment nicht beantwortet werden. Beide Gene kommen in mehreren, aber sequenzverschiedenen Kopien im Genom vor, sodass eine spezifische Amplifikation möglich ist. Die Gene, die in diesem Arbeitspaket näher untersucht wurden, erhielten der Einfachheit wegen die Bezeichnung 464 (HflB) und 460 (ATPase). Mit beiden Genen wurde die Komplexität der AP-Populationen charakterisiert. Von allen Pflanzen wurde an drei Terminen (Frühjahr, Sommer, Herbst) je drei Wurzel- und Sprossproben entnommen und die DNA extrahiert. Phytoplasma-spezifische Fragmente fast aller Proben konnten mit den 464 Primern amplifiziert werden. Die PCR Fragmente der jeweiligen Wurzel- und Sprossproben wurden vereinigt und kloniert. Zwanzig klonierte Fragmente wurden in SSCP Analysen untersucht. In den Aprilproben wurden bis zu fünf unterschiedliche Muster gefunden, wobei meist ein Muster dominierte (Tabelle 3). Im Juni nahm die Anzahl der Muster bei einigen Proben ab (z.B. 1/93). Dies deutet auf eine massive Verschiebung der Population in Richtung dieses Stamms hin. Die übrigen Stämme sind sehr wahrscheinlich noch vorhanden, aber bei der Zahl untersuchter Klone nicht mehr repräsentiert. Besonders interessant sind die Verhältnisse beim Stamm 1/93 und 3/6. Der Stamm 1/93 zeigte in den vergangenen zwei Jahren mit zunehmender Intensität Hexenbesen. Auch das SSCP Muster hat sich deutlich verändert. Jeweils zur Mitte oder

Ende des Jahres wurde ein Muster dominant. Dies trat in 2014 wesentlich früher auf als im Jahr 2013. Die Dominanz eines bestimmten Pathogenstamms steht sehr wahrscheinlich in direkter Verbindung zur verstärkten Hexenbesenbildung. Zurückliegende Daten liegen nur unvollständig vor, aber es muss in 2012 ein Ereignis stattgefunden haben, das eine zunehmende Hexenbesenbildung begünstigte. Die Ursache kann in einer Verschiebung des Verhältnisses vorhandener Stämme liegen, oder es hat eine Neuinfektion durch einen virulenteren Stamm stattgefunden, der alle anderen "überwachsen" hat. Auch beim Stamm 3/6 war eine Veränderung der Population im Beobachtungszeitraum festzustellen (Abb. 1). Zu Anfang der Untersuchungen waren die Muster aus Spross und Wurzel einheitlich. Im Oktober 2013 trat im Spross ein weiteres Muster auf, welches im Juni 2014 auch in der Wurzel zu beobachten war. In allen untersuchten Bäumen sind mehrere AP-Stämme vertreten, wobei es sich um virulente und avirulente Typen handelt. Wir vermuten, dass die Vermehrung eines bestimmten Stamms die Krankheitsentwicklung maßgeblich beeinflusst. Die Situation muss jedoch für die Wurzel und den Spross getrennt betrachtet werden. In den Pflanzen hat sich über die Jahre sehr wahrscheinlich ein Gleichgewicht der Stämme eingestellt, wobei der Wurzel als "Überwinterungsort" eine wesentliche Rolle zukommt. Von hier findet die Wiederbesiedlung des neu gebildeten Sprossphloems im Frühjahr statt, bei der besser angepasste oder fittere Stämme den Spross schneller besiedeln und das Krankheitsgeschehen maßgeblich beeinflussen können.

Im real time-PCR Assays wurde das Gen 460 amplifiziert und die Anzahl der Organismen mithilfe eines Standards bestimmt. Der Assay besteht aus zwei Primerpaaren und zwei spezifischen Taqman-Sonden und ermöglicht eine Unterscheidung virulenter und avirulenter Stämme aufgrund unterschiedlicher Sequenzmotive. Die extrahierte DNA wurde mit diesem System untersucht und ein Mittelwert aus den drei zusammengehörigen Proben gebildet (Tabelle 4). Die Amplifikation von Fragmenten des Stamms 3/93 mit beiden Primerpaaren war unbefriedigend. Möglicherweise ist hier ein AP-Stamm oder Stammgemisch mit unterschiedlichen Primerbindungsstellen vorhanden. Nur der Stamm 3/6 zeigte in Bezug auf die Gegenwart virulenter und avirulenter Stämme eine einheitliche Reaktion. Hier wurden in allen Proben nur virulente Typen festgestellt. Alle anderen Proben zeigten eine Mischung aus virulenten und avirulenten Stämmen. Dabei lag nicht nur das Zahlenverhältnis auf der Seite der virulenten Stämme, sondern auch der Organismen-titer war deutlich höher. Einige Besonderheiten waren zu beobachten. Erneut zeigte der Stamm 1/93 eine Veränderung während des Beobachtungszeitraums. Zu Beginn der Untersuchung konnten virulente und avirulente Typen nur in der Wurzel nachgewiesen werden. Später konnte der virulente und noch später auch der avirulente Typ im Spross detektiert werden. Die Sprossbesiedlung könnte durchaus in Zusammenhang mit der Hexenbesenbildung stehen. In früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass Hexenbesen nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Phytoplasmen gebildet werden. Der Stamm 8/93, der über die Jahre einen geringeren Symptomboniturwert aufweist, zeigt wie anfänglich 1/93, nur selten eine Besiedlung des Sprosses. In der Wurzel sind virulente Typen immer nachweisbar. Dies spricht dafür, dass der Sprossbesiedlung eine entscheidende Rolle zufällt. Bei den Stämmen 10/93, 12/93 und 14/93 ist die Besiedlung von Wurzel und Spross ausgeglichen. Während bei den Stämmen 10/93 und 14/93 sowohl virulente wie auch avirulente Typen vorhanden sind, ist beim Stamm 12/93 fast ausschließlich der virulente Stamm vorhanden.

Die Möglichkeit die Pathogenstämme aus einer Pflanze zu differenzieren ist erst seit Kurzem möglich. Aber bereits jetzt hat sich ein sehr komplexes Bild in der Zusammensetzung der Stämme und der Besiedlungsdynamik ergeben. Obwohl wir virulente und avirulente Stämme molekular differenzieren können, sind die Faktoren, die zur Symptomausprägung führen unklar. Die Hinweise mehren sich, dass eine Besiedlung des Sprosses für eine Symptombildung unbedingt nötig ist. Eine Besiedlung der Wurzel, auch durch einen stark virulenten Stamm, scheint dafür nicht auszureichen. Inwieweit der physiologische Zustand der Pflanze eine Rolle spielt ist wenig erforscht. In Italien wurde ein ähnliches Phänomen als systemic acquired resistance beschrieben, bei dem symptomlose Bäume im Spross frei und

in der Wurzel besiedelt sind. Die Autoren haben biochemische Prozesse im Phloembereich für die "Resistenz im Spross" verantwortlich gemacht.

3.1.3.3. Untersuchungen zur Krankheitsentwicklung einheitlich inokulierter Bäume unter unterschiedlichen klimatischen Bedingungen in insektensicheren Gewächshäusern (WP4)

Die vier AP-infizierten Pflanzen zeigten als spezifische Symptome im Frühjahr 2014 vergrößerte Nebenblätter und im September bildete eine von vier Pflanzen Hexenbesen und zeigte Rotlaubigkeit. Alle Pflanzen zeigten einen adäquaten Zuwachs über die Vegetationsperiode. Die 14 PD-infizierten Pflanzen zeigten im September keine krankheitsspezifischen Symptome. Auch sie zeigten einen deutlichen Zuwachs während der Vegetationsperiode. Zehn Pflanzen aus dem Bestand ESFY-infizierter Individuen trieben bereits im Februar aus und 18 der 20 Pflanzen zeigten typische Blattrollsymptome und einen reduzierten Wuchs.

Der Winter 2013/2014 war mild und nur gelegentlich gab es leichte Minustemperaturen (Abb. 2). Die Symptomentwicklung in 2014 war bei den Testpflanzen nur zum Teil typisch. Abweichend zu den Vorjahresergebnissen verursachte der AP Stamm 3/6 nur bei 25% der Individuen Hexenbesen. Allerdings bildeten alle Pflanzen zu Jahresbeginn deutliche Nebenblätter aus. Bei den PD-infizierten Pflanzen traten bis zum Projektende keine spezifischen Symptome auf. Im Gegensatz dazu zeigten 90% der ESFY-infizierten Pflanzen starke und typische Blattrollsymptome. Der frühe Austrieb einiger Pflanzen als Reaktion auf eine Infektion ist typisch, könnte jedoch auch durch die milden Temperaturen bedingt oder gefördert worden sein.

Während der Bonitur wurden Gewebeproben zur DNA Extraktion und anschließenden real time-PCR Analyse entnommen. Alle 2014 entnommenen Proben AP-infizierter Pflanzen waren PCR-positiv (Tabelle 5). Auch die Proben vom Juli und November des Vorjahrs waren PCR-positiv. Davor gab es einige negative Ergebnisse. Von den PD-infizierten Birnen konnten im August 2014 elf als infiziert bestätigt werden. In drei konnten keine Phytoplasmen nachgewiesen werden. Diese zeigten zwar im Vorjahr Werte, die auf eine Besiedlung an der Nachweisgrenze schließen ließen, aber in nachfolgenden Tests konnte eine Infektion nicht bestätigt werden. In vier Pflanzen konnten Phytoplasmen nur in der Wurzel nachgewiesen werden. In den Mittelrippen waren in 6 Pflanzen Erreger nachweisbar (Tabelle 6). Von 20 ESFY-infizierten Aprikosen konnten in 18 Pflanzen Phytoplasmen nachgewiesen werden. Während der Erregernachweis in der Wurzel und dem Spross bei fast allen Proben bereits im Frühjahr möglich war, konnten nur bei 2 Pflanzen Phytoplasmen in den Mittelrippen nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Die Besiedlungsdynamik unter den klimatischen Bedingungen am Standort Dossenheim verlief entsprechend früherer Beobachtungen. Die Wurzel war stets der Ort, an dem Phytoplasmen ganzjährig nachweisbar waren. Dies gilt für Kern- und Steinobst gleichermaßen. Im Spross baute sich die Population im Jahresverlauf auf. Dies war für alle Pflanzen bereits im April bzw. Mai festzustellen. Dieser frühe Nachweis ist sehr wahrscheinlich durch die geringe Größe der Pflanzen bedingt, bei der die Besiedlung des gesamten Sprosses rasch erfolgte. In der Besiedlung der Mittelrippen unterschieden sich die Versuchspflanzen deutlich. Während beim Apfel ein Nachweis problemlos möglich war, gelang er bei den Birnen seltener und bei Aprikosen nur in wenigen Fällen. Mittelrippen sind daher für einen sicheren Nachweis ungeeignet. Der Phytoplasmatiter war zu Projektende in allen Pflanzen hoch. Ein Ct-Wert zwischen 18 und 25 ist typisch für eine hohe Besiedlungsdichte. Die Werte waren in den Wurzeln allen Versuchsgruppen sehr einheitlich.

Die Untersuchungen der infizierten Kern- und Steinobstpflanzen am Standort Dossenheim ergab zu früheren Beobachtungen keine abweichenden Ergebnisse. Dies war auch nicht zu erwarten, da die Phytoplasmaisolate in den Vorjahren bereits in anderen Versuchen getestet wurden. Die besondere Bedeutung dieses Versuchs ergibt sich aus dem Vergleich der

Ergebnisse aller Projektpartner. Beim Interimstreffen in Wien wurde von italienischer Seite eine andere Symptomatik bei den AP-infizierten Pflanzen beschrieben. Ergebnisse aus 2014 liegen noch nicht vor, werden aber bis zur Abgabe des EU Berichts erwartet. Die Krankheits Symptome und Phytoplasmentiter in den nach in Österreich, Belgien und der Tschechei verschickten Versuchspflanzen, scheinen denen in Dossenheim zu entsprechen. Eine genaue Darstellung wird im EU Bericht folgen.

3.1.3.4. Verbesserung der Diagnose von Obstphytoplasmosen durch effizientere und sensitivere diagnostische Verfahren (LAMP) (WP5)

Dieses Arbeitspaket wurde während der Projektlaufzeit in Dossenheim nicht bearbeitet. Zur Begründung siehe Punkt 4.

4. Durchgeführte Arbeiten im Vergleich zu den geplanten Arbeiten

Die Untersuchungen im WP2 sind abgeschlossen. Eine Teilnahme weiterer Vermehrungsbetriebe wäre vorteilhaft gewesen, um eine breitere Basis für die Abschätzung der latenten Infektionen zu erhalten. Die geringe Resonanz der Betriebe ist wohl auf die strengen Quarantäneregelungen bei Phytoplasmabefall zurückzuführen, die trotz Zusage auf Vertraulichkeit, eine Teilnahme verhindert haben. Die Arbeiten im WP3 wurden ebenfalls abgeschlossen. Zwei verschiedene Systeme, basierend auf zwei verschiedenen Genen wurden angewandt, um die Komplexität und Dynamik sowie die Virulenz/Avirulenz ausgewählter AP-Stämme zu untersuchen. Trotz anfänglichem Interesse verschiedener Projektpartner wurden Arbeiten zu WP3 nur in Dossenheim durchgeführt. Es wäre interessant gewesen, die Daten zu AP-Populationen, das Verhältnis von Virulenz zu Avirulenz und die Populationsdynamik in anderen Ländern mit den hier erhaltenen Ergebnissen zu vergleichen. Arbeitspaket 4 ist ebenfalls abgeschlossen. Vier Partnerländer erhielten einheitlich inokulierte Pflanzen zur Beobachtung. Eine Beobachtungszeit von zwei Vegetationsperioden ist jedoch sehr kurz, um den Einfluss äußerer Faktoren für die Symptomentwicklung zu beurteilen, insbesondere wenn einzelne Jahreszeiten atypisch verlaufen. Nach bisherigen Informationen scheinen nur in Italien Unterschiede in der Symptomatik aufgetreten zu sein. Leider sind die nach Norwegen verschickten Versuchspflanzen verloren gegangen, denn es wäre aufschlussreich gewesen, die extremen geographischen Lagen zu vergleichen. Das WP5 wurde in Dossenheim nicht bearbeitet. Dies ist dadurch begründet, dass die belgischen Projektpartner die Arbeiten im ersten Jahr nicht begonnen haben. Beim Abschlusstreffen in Sion (Schweiz) hat einer der belgischen Partner (Kris DeJonghe) seine Arbeiten und Ergebnisse zur Etablierung eines LAMP Systems vorgestellt. Basierend auf Sequenzen der 16SrDNA wurden Primer entwickelt, um eine effiziente isothermale Amplifikation zu erreichen. Dabei wurden verschiedene DNA Extraktionsmethoden erprobt. Parallel dazu wurden die Experimente mit etablierten real time-PCR Assays durchgeführt, um die Resultate zu vergleichen. Eine ausführliche Darstellung erfolgt im EU Bericht.

5. Positionen der Istaussgabe im Vergleich zu den geleisteten Arbeiten

Die Projektmittel im Zuweisungsbescheid beliefen sich auf 24.985,37€. Nach Kürzungen im Verbrauchsmittelbereich verblieben 21.858,44€. Davon wurden 17.640,00€ für Personalausgaben verwendet. Die Hilfskraft wurde zur Aufarbeitung der in WP2 und WP4 anfallenden Proben benötigt. Die Verbrauchsmittel in Höhe von 2.574,56€ wurden für Laborchemikalien, Feinreagenzien und Plastikmaterial verwendet. Die beantragten 979,37€ für die Vergabe eines Auftrags (Herstellung eines polyklonalen Serums) wurden nicht in Anspruch genommen und dem Verbrauchsmitteltitel zugeschlagen. Die Reisemittel wurden für das Interimstreffen in Wien und das abschließende Projekttreffen in Sion benötigt. Damit blieben alle Ausgaben im Rahmen der zugewiesenen Mittel. Mit Ausnahme des WP5 wurden die Projektziele erreicht.

6. Kurzfassung

Kern- und Steinobstphytoplasmen verursachen in der EU große wirtschaftliche Schäden, die alle Produktionsebenen betreffen. In Erwerbsanlagen äußert sich dies in einer Verringerung der Produktivität und reicht bis zum Absterben anfälliger Sorten. In Vermehrungsbetrieben werden aufgrund der EU Richtlinien Vermarktungs- und Anbauverbote ausgesprochen. Eine wirksame Kontrolle der Krankheiten ist im Moment nur durch eine Vektorenbekämpfung möglich. Im ERA-NET Projekt AOPHYT wurden Fragestellungen bearbeitet, die im Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung und der Symptomausprägung infizierter Pflanzen stehen. Die latente Infektion von Kern- und Steinobst wurde in Neuanpflanzungen im Reiserschnittgarten Weinsberg über zwei Jahre untersucht. Vor der Neupflanzung wurden alle 3000 Apfelbäume und 500 Birnbäume getestet. In drei Birnbäumen wurden Phytoplasmen gefunden. In den zwei darauf folgenden Jahren wurde visuell kontrolliert und Stichproben aus diesen Beständen und aus bereits bestehenden Steinobstbeständen entnommen. Keine der Pflanzen zeigte typische Symptome und alle PCR Tests verliefen negativ. Molekulare Untersuchungen ergaben, dass in triebsucht-infizierten Apfelbäumen virulente und avirulente Typen vorkommen. Meist waren beide Typen vorhanden, wobei sich die Populationen in Spross und Wurzel häufig unterschieden. Die Besiedlungsdynamik bzw. die Veränderung der AP-Typen in Verbindung mit dem unregelmäßigen Auftreten der Symptome wird für die Krankheitsentwicklung verantwortlich gemacht. Die genauen Voraussetzungen, die für eine Besiedlung des Sprosses notwendig sind, müssen jedoch noch erforscht werden. Der Einfluss abiotischer Faktoren auf die Krankheitsentwicklung von triebsucht-, verfalls- und vergilbungs-infiziertem Kern- und Steinobst wurde an unterschiedlichen Standorten in Europa mit einheitlich infiziertem Material untersucht. Am Standort Dossenheim bildeten die infizierten Pflanzen im ersten Jahr typische Symptome, jedoch nicht alle im zweiten Jahr. Langfristige Beobachtungen sind nötig.

In the EU pome- and stone fruit phytoplasmas cause high economic losses on all levels of production. In high intensity orchards a loss in productivity to a decline of susceptible cultivars can be observed. In nursery stocks a sale ban and clearing is imposed according to EU regulations. At present an effective control is only possible by controlling the vectors. Within the ERA-NET project AOPHYT aspects related to disease and symptom development were treated. Latent infection of pome- and stone fruit was examined in a bud wood production site at Weinsberg over a period of two years. All 3000 apple and 500 pear trees were examined before planted and phytoplasmas were detected in three pear trees. In the two subsequent years plants were visually controlled and random samples taken, also from stone fruit trees. None of the plants showed typical phytoplasma symptoms nor were they PCR-positive. Molecular studies revealed that proliferation-diseased apple carry virulent and non-virulent pathogen types. Mostly both types are present, although, the populations were often different in roots and canopy. The population dynamics and the shift in pathogen types together with the erratic symptom appearance are considered responsible for disease development. The exact precondition for the canopy colonization needs to be investigated further. The influence of abiotic factors on the disease development of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows affected pome- and stone fruit trees was observed at different locations in Europe using uniformly infected material. At the Dossenheim location the infected plants developed typical disease symptoms the first year, but not in the second year. Long term observations are necessary.

Tabelle 1. Apfel-, Birnen, und Steinobtsorten die 2014 im Reiserschnittgarten Weinsberg beprobt wurden.

Apfelsorten	Birnensorten	Steinobtsorten
ACW 6375	Alexander Lukas	Miné
ACW 14959	Bayerische Weinsbirne	Compact
ACW 10442	Bosc's Flaschenbirne	Hilde
Roter Eiserapfel	Bunte Julibirne	Clarina
Rote Sternnelke	Clapps Liebling	Platiforme
Roter Berlepsch	Cando	
Roter Boskop	Conference	
Roter Boskop Wolf	Eckehard	
Roter Gravensteiner Rellstab	Gellerts Butterbirne	
Roter James Grieve	Gute Graue	
Saturn	Gute Denise von Avranches	
Schneica, Jonica	Harrow Delight	
Schneiderapfel	Hollow Sweet	
Schweitzer Orangenapfel	Karcherbirne	
Schampion	Kirchensaller	
Granny Smith	Metzer Bratbirne	
Sirius	Novembra	
Sonate	Packhams Triumph	
Sommerregent	Palmischbirne	
Sonnenwirtsapfel	Pastorenbirne	
Stark Earliest	Precocie Morettini	
Summerred	Rote Williams Christ	
Thurgauer Weinapfel	Schweizer Wasserbirne	
Solaris	Schweitzer Hose	
Weisser Klarapfel	Star Krimson	
Karneval	Stuttgarter Geisshirtle	
Merkur	Sulibirne	
ACW 442 Galiwa	Tangern	
ACW 14995	Vereinsdechant	
ACW 6375	Wahlsche Schnapsbirne	
Apistar	Wilde Eierbirne	
AW 105 Sapora	Williams Christ	
Pomfital		
Pomgold		
Baya Marisa		

Tabelle 2. Untersuchte Bäume aus der AP Stammsammlung am Standort JKI Dossenheim.

Bezeichnung	Herkunft	Ø cm (2005)*	CDI (2010)#	Symp. 2013	Symp. 2014
1/93	F-Burgund	40	0	Hb	Hb
3/6	D-Dossenheim	-	-	Hb	Hb
3/93	D-Haubersbronn	7	35	Kw	Kw
6/93	D-Dossenheim	13	33,5	Kw	Kw
8/93	D-Dossenheim	45	1	nS	nS
10/93	D-Gaiberg	24	24,5	nS	IL
12/93	D-Dossenheim	15	34,5	Kf	Kf
14/93	D-Dossenheim	13,5	30	Kf	Kf

* = Stammdurchmesser nach 12 Standjahren; # = Kumulativer Krankheitsindex nach 17 Jahren Standzeit. Jedes Jahr wurden Boniturwerte von 0 (keine Symptome) bis 3 (Kleinfrüchtigkeit, Hexenbesen) vergeben, wobei nur der höchste Wert berücksichtigt wurde. Wb, Hexenbesen; Kw, Kleinwüchsig; nS, keine Symptome; IL, hellere Laubfärbung; Kf, Kleinfrüchtigkeit.

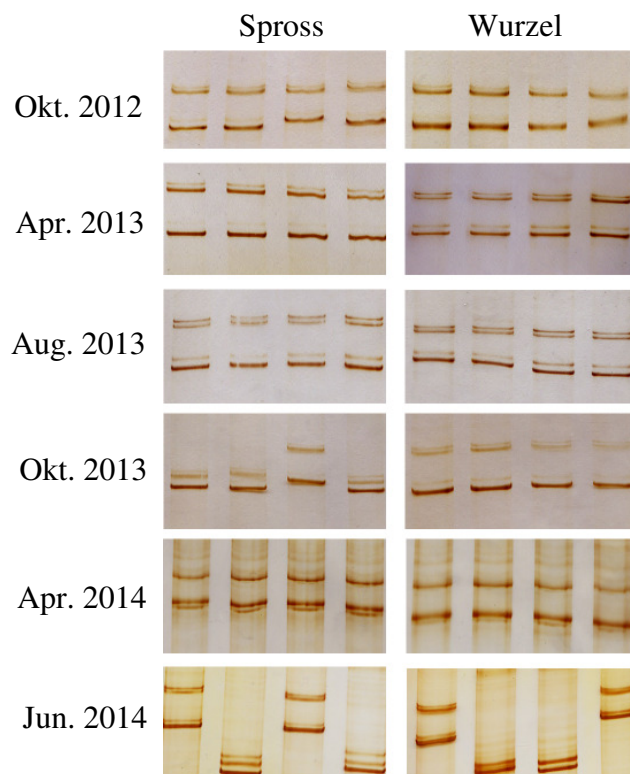


Abb. 1. SSCP Muster klonierter 464 PCR Fragmente des AP Stamms 3/6. Eine Auswahl der Muster aus Spross und Wurzel zu den verschiedenen Probenahmezeiten ist dargestellt.

Tabelle 3. Ergebnisse der SSCP Analysen der verschiedenen Stämme zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Die Komplexität der Muster und ihr zahlenmäßiges Verhältnis zueinander sind dargestellt.

		Okt. 12		Apr. 13		Aug. 13		Nov. 13		Apr. 14		Jun. 14	
1/93	Wurzel	nd		2*	3-17~	4	1-1-3-15	1	19	4	2-3-5-10	1	20
	Spross	nd		-		3	1-2-17	2	3-17	2	3-17	1	18
3/6	Wurzel	1	19	3	1-1-18	1	20	1	20	1	20	3	1-7-12
	Spross	1	20	2	1-18	2	1-18	2	2-18	1	20	3	4-8-8
3/93	Wurzel	-		-		nd		2	10-10	4	1-4-6-9	2	15-15
	Spross	-		-		nd		2	4-16	5	1-1-1-17	3	1-8-11
6/93	Wurzel	3	2-5-12	2	2-18	4	2-2-4-6	4	1-2-4-13	2	9-11	3	2-7-11
	Spross	-		3	1-8-9	3	1-2-14	2	3-17	3	1-6-8	2	9-11
8/93	Wurzel	2	4-14	2	2-18	1	20	1	20	2	1-18	2	3-17
	Spross	-		2	1-19	-		1	20	5	1-3-4-5-6	2	10-10
10/93	Wurzel	-		2	1-19	2	5-15	4	2-3-4-6	2	1-19	2	2-18
	Spross	-		1	20	2	8-12	2	7-10	2	5-13	3	1-8--11
12/93	Wurzel	2	1-18	3	1-2-15	2	1-19	3	1-2-17	1	18	2	1-1-18
	Spross	1	19	2	4-16	1	20	1	20	2	1-19	3	2-2-16
14/93	Wurzel	3	1-3-16	3	1-5-14	3	1-5-14	2	1-19	3	1-4-15	2	5-14
	Spross	2	2-18	2	8-12	2	2-17	2	1-19	2	5-13	3	1-1-15

*= Anzahl unterschiedlicher Muster. ~ = Zahlenverhältnis der Muster zueinander. nd, keine Probenahme; -, keine Amplifikation des betreffenden Virulentyps.

Tabelle 4. Zusammenfassung der real time-PCR Resultate mit den virulenzspezifischen Primerpaaren. Die Bestimmung des Organismtiters erfolgte mittels eines klonierten Standards.

		Okt 12		Apr 13		Aug 13		Nov 13		Apr 14		Jun 14	
		avirulent	virulent	avirulent	virulent	avirulent	virulent	avirulent	virulent	avirulent	virulent	avirulent	virulent
1/93	Wurzel	nd	nd	1,00E+07*	2,00E+08	3,00E+06	1,00E+08	7,00E+04	1,00E+04	3,00E+06	8,00E+07	4,00E+07	1,00E+07
	Spross	nd	nd	-	-	-	2,00E+10	-	3,00E+05	5,00E+05	3,00E+10	1,00E+05	1,00E+05
3/6	Wurzel	-	2,00E+09	-	9,00E+10	-	6,00E+10	-	9,00E+10	-	9,00E+08	-	2,00E+10
	Spross	-	9,00E+10	-	3,00E+05	-	6,00E+10	-	9,00E+12	-	2,00E+07	-	2,00E+10
3/93	Wurzel	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	8,00E+03	-	-
	Spross	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	2,00E+04	-	-
6/93	Wurzel	-	3,00E+07	-	7,00E+09	7,00E+07	2,00E+09	4,00E+06	9,00E+07	-	9,00E+09	-	1,00E+09
	Spross	-	-	-	3,00E+09	-	2,00E+08	-	5,00E+08	-	5,00E+09	-	4,00E+11
8/93	Wurzel	-	5,00E+07	2,00E+06	1,00E+09	-	9,00E+08	-	2,00E+07	-	1,00E+10	-	7,00E+07
	Spross	-	-	-	3,00E+06	-	-	-	-	-	6,00E+04	-	-
10/93	Wurzel	1,00E+06	3,00E+07	5,00E+07	2,00E+09	1,00E+08	2,00E+10	6,00E+07	2,00E+10	8,00E+07	6,00E+10	9,00E+09	5,00E+10
	Spross	-	-	5,00E+06	1,00E+07	2,00E+08	3,00E+08	4,00E+06	2,00E+07	9,00E+06	3,00E+08	2,00E+07	1,00E+07
12/93	Wurzel	-	2,00E+08	-	2,00E+10	-	5,00E+09	-	4,00E+13	2,00E+08	2,00E+11	-	5,00E+10
	Spross	-	4,00E+09	-	1,00E+10	-	3,00E+10	1,00E+03	8,00E+10	-	5,00E+12	3,00E+05	2,00E+10
14/93	Wurzel	3,00E+06	4,00E+08	2,00E+08	3,00E+10	1,00E+08	9,00E+09	8,00E+06	2,00E+07	1,00E+08	9,00E+10	2,00E+09	3,00E+08
	Spross	4,00E+07	2,00E+08	2,00E+08	5,00E+09	1,00E+09	-	1,00E+07	-	1,00E+08	2,00E+11	5,00E+07+	1,00E+08

nd, keine Probenahmet. -, keine Phytoplasmen dieses AP-Typs nachweisbar

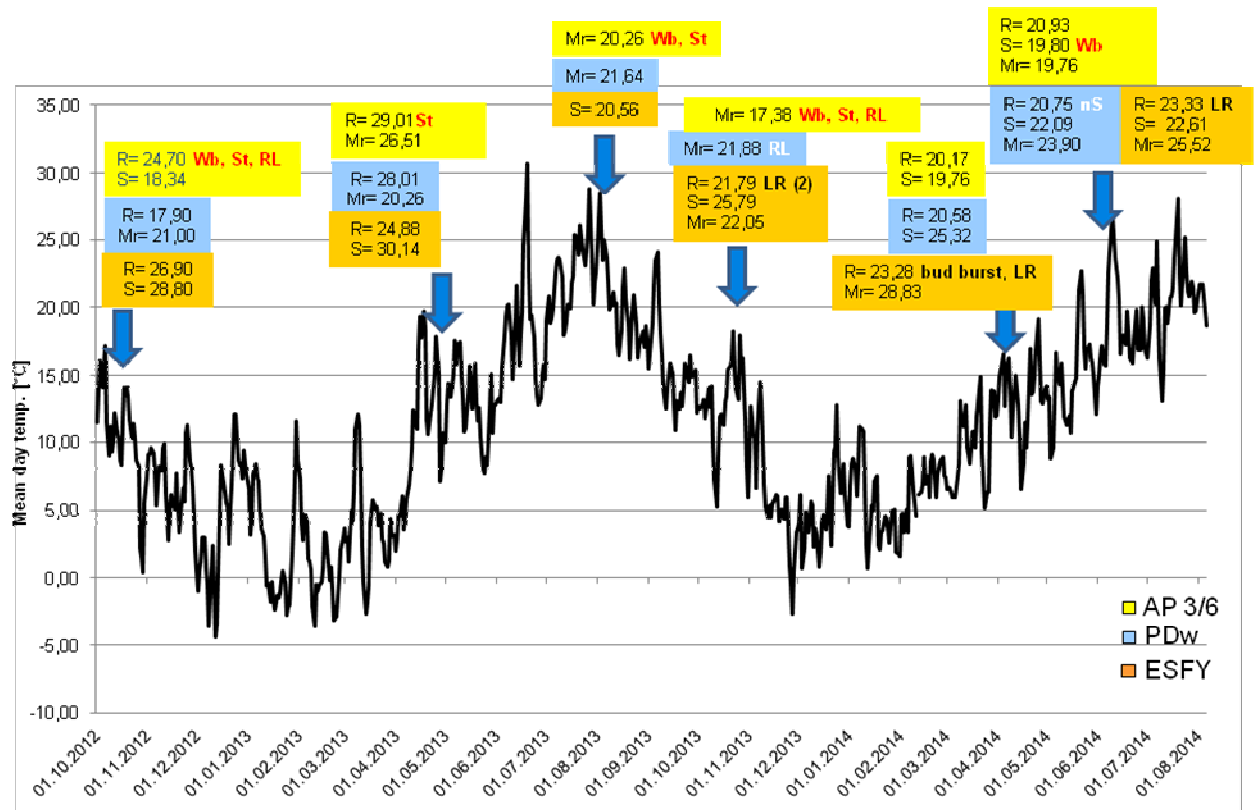


Abb. 2. Durchschnittliche Jahrestemperatur und Besiedlung der Versuchspflanzen im Beobachtungszeitraum (01.10.2012 – 01.08.2014) für den Standort Dossenheim. Typische Krankheitssymptome wurden bonitiert (Wb, Hexenbesen; St, vergrößerte Nebenblätter, RL, Rotlaubigkeit; LR, Blattrollen, nS keine Symptome). Die relative Anzahl der Phytoplasmen wurde durch quantitative PCR ermittelt (<23 hoher Pathogentiter; 23-29 mittlere Pathogentiter; >29 schwache Besiedlung).

Tabelle 5. Ergebnisse der quantitativen PCR Analysen aus AP-infizierten Apfelpflanzen zu verschiedenen Terminen.

		17.10.2012	23.05.2013	17.07.2013	01.11.2013	06.04.2014	23.08.2014
#1	Wurzel	N/A	25,51*			19,84	21,4
	Spross	15,36				19,4	20,63
	Mittelrippe		33,08	21,04	17,33		19,35
#2	Wurzel	27,02	29,45			19,66	20,05
	Spross	16,13				19,4	18,7
	Mittelrippe		N/A	21,16	17,9		19,92
#3	Wurzel	N/A	N/A			19,87	20,69
	Spross	18,95				20,61	19,87
	Mittelrippe		N/A	20,78	17,04		19,42
#4	Wurzel	N/A	33,05			21,31	21,58
	Spross	24,74				19,62	20
	Mittelrippe		N/A	20,18	17,26		20,33

*, Die relativen Ct Werte sind angegeben. Ansteigende Ct Werte spiegeln eine Abnahme des Phytoplasmantiters im Gewebe wider (siehe Text Abb. 2). N/A, kein Ergebnis nach qPCR; leere Felder, keine Analyse des betreffenden Pflanzenorgans.

Tabelle 6. Ergebnisse der quantitativen PCR Analysen aus PD-infizierten Birnen zu verschiedenen Terminen.

		17.10.2012	28.05.2013	17.07.2013	01.11.2014	06.04.2014	23.08.2014
#1	Wurzel	16,88	35,96			21,25	24,82
	Spross	21,02				24,36	35,88
	Mitterippe		20,13	22,12	20,8		37,6
#2	Wurzel	N/A	N/A			N/A	36,2
	Spross	N/A				N/A	37,38
	Mitterippe		N/A	29,89	31,98		37,21
#3	Wurzel		22,27			20,44	21,89
	Spross					24,33	22,17
	Mitterippe		20,39	21,02	19,06		21,4
#4	Wurzel		22,96			21,41	29,28
	Spross					24,7	36,9
	Mitterippe		18,16	21,18	19,48		37,68
#5	Wurzel		29,34			20,7	20,6
	Spross					25,59	20,51
	Mitterippe		19,01	21,36	19,25		22,07
#6	Wurzel		31,59			20,75	22,83
	Spross					25,29	25,24
	Mitterippe		21,97	22,35	20,46		35,3
#7	Wurzel		35,93			21,72	25,18
	Spross					26,25	22,21
	Mitterippe		23,61	21,81	20,29		26,38
#8	Wurzel		38,35			19,51	21,51
	Spross					27,87	21,1
	Mitterippe		23,13	22,46	19,75		24,93
#9	Wurzel		23,26			21,13	21,34
	Spross					25,38	21,15
	Mitterippe		21,01	21,62	19,93		23,37
#10	Wurzel		N/A			N/A	35,59
	Spross					N/A	36,81
	Mitterippe		N/A	29,49	34,14		36,57
#11	Wurzel		22,36			20,05	22,69
	Spross					24,97	22,28
	Mitterippe		18,17	20,99	20,04		25,27
#12	Wurzel		21,93			19,62	29,38
	Spross					24,03	35,72
	Mitterippe		18,19	21,01	19,11		37
#13	Wurzel		34,45			19,81	21,85
	Spross					25,78	36,8
	Mitterippe		19,06	22,13	20,14		36,46
#14	Wurzel		N/A			N/A	35,9
	Spross					N/A	36,22
	Mitterippe		N/A	29,64	32,88		35,58

Zu Einzelheiten siehe Text Tabelle 5.

Tabelle 7. Ergebnisse der quantitativen PCR Analysen von ESFY-infizierten Aprikosen zu verschiedenen Terminen.

		17.10.2012	28.06.2013	17.07.2013	01.11.2014	06.04.2014	17.06.2014	23.08.2014
#1	Wurzel	26,96	N/A		33,63	N/A	N/A	37,01
	Spross	28,82		29,17	N/A	N/A		37
	Mittelrippe		N/A				N/A	N/A
#2	Wurzel	N/A	N/A		31,77	N/A	N/A	35,98
	Spross	N/A		29,95	N/A	N/A		36,18
	Mittelrippe		N/A				N/A	N/A
#3	Wurzel		N/A		23,65	27,26	24,62	22,4
	Spross			20,09	39,81	19,55		23,49
	Mittelrippe		27,29		19,69		34,7	23,91
#4	Wurzel		N/A		21,24	26,07	23,61	22,82
	Spross			20,06	N/A	N/A		23,76
	Mittelrippe		N/A		N/A		36,45	N/A
#5	Wurzel		29,1		20,38	22,65	21,1	22,58
	Spross			21,64	25,33	22,74		21,12
	Mittelrippe		N/A		23,11		N/A	N/A
#6	Wurzel		27,47		22,16	25,54	22,29	22,13
	Spross			19,41	37,96	17,76		20,83
	Mittelrippe		39,25		38,01		N/A	N/A
#7	Wurzel		21,83		22,56	22,83	22,78	23,16
	Spross			19,43	N/A	17,89		21,58
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	27,12
#8	Wurzel		21,55		23,11	24,58	23,17	21,63
	Spross			21,18	N/A	18,72		20,53
	Mittelrippe		25,64		N/A		N/A	N/A
#9	Wurzel		23,5		22,31	26,94	23,59	22
	Spross			18,68	22,91	17,51		25,38
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	39,05
#10	Wurzel		21,46		20,05	27,31	23,17	21,25
	Spross			20,14	22,06	15,2		20,42
	Mittelrippe		N/A		27,5		29,06	N/A
#11	Wurzel		31,75		22,51	25,56	24,44	25,75
	Spross			19,49	29,14	16,15		20,09
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	38,82
#12	Wurzel		26,13		21,22	25,08	24,47	22,82
	Spross			19,68	23,6	17,86		23,7
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	N/A
#13	Wurzel		22,35		21,01	24,13	22,24	25,12
	Spross			20,6	27,72	16,6		20,58
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	N/A
#14	Wurzel		N/A		21,89	24,88	22,39	24,63
	Spross			29,37	N/A	34,05		30,45
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	N/A
#15	Wurzel		27,15		20,7	21,05	23,21	22,46
	Spross			19,22	31,29	17,43		21,08
	Mittelrippe		N/A		22,32		28,6	N/A
#16	Wurzel		23,85		24,02	27,15	25,77	28,32
	Spross			20,29	32,47	17,72		22,69
	Mittelrippe		27,74		39,34		N/A	N/A
#17	Wurzel		21,57		20,97	23,35	22,86	22,06
	Spross			19,13	18,19	15,52		20,81
	Mittelrippe		33,1		27,17		N/A	N/A
#18	Wurzel		25,76		22,39	23,72	22,18	
	Spross			19,1	35,03	16,43		
	Mittelrippe		N/A		17,4		N/A	
#19	Wurzel		20		20,52	23,06	24,62	22,71
	Spross			20,29	25,22	16,17		22,89
	Mittelrippe		32,25		17,17		N/A	N/A
#20	Wurzel		35,31		21,47	29,11	22,52	24,81
	Spross			21,25	36,03	27,49		24,98
	Mittelrippe		N/A		N/A		N/A	N/A

Zu Einzelheiten siehe Text Tabelle 5.