

Möglichkeiten und Grenzen beim Nachweis von *Agrobacterium vitis* in Reben mittels unterschiedlicher auf PCR basierender Methoden

MONIKA RIEDLE-BAUER, JUDITH MÖRTEL, HELMUT BAUER und ASTRID KNOBLING

Lehr- und Forschungszentrum für Wein- und Obstbau Klosterneuburg
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: Monika.Riedle-Bauer@weinobst.at

Verschiedene Verfahren zur Diagnose von Agrobacterium vitis in Rebmateriale wurden verglichen. Zu mehreren Jahreszeiten wurden Trieb-, Wurzel- und Tumormaterial symptomtragender Reben und mutmaßlich latent infizierter Reben analysiert. Die Extraktion der bakteriellen DNA erfolgte entweder unter Einbeziehung eines Anreicherungsschritts auf einem Semiselektivmedium oder direkt aus Rebgewebe. Mittels einfacher und nested-PCR wurden Gene aus dem Bakterienchromosom und dem Ti-Plasmid amplifiziert. Mit Hilfe einer direkten DNA-Präparation und nested-PCR konnte das Pathogen in einem hohen Anteil an Trieb-, Tumor- und Wurzelproben nachgewiesen werden. Ein Nachweis aus ruhendem Holz gelang allerdings nur mit Bakterienanreicherung auf Selektivmedium gefolgt von einer nested-PCR. Mit dieser Technik war es möglich, bei der Untersuchung von symptomtragenden Reben in Tumormaterial in 83 bis 93 %, in Triebmaterial im Herbst in etwa 70 % und in Wurzeln im späten Frühjahr in etwa 80 % der Proben den Erreger nachzuweisen. Im Sommer wurden schwankende und eher geringe Nachweisraten beobachtet. In ruhendem Holz im Winter konnte der Erreger je nach Probenahmezeitpunkt in 16,7 % bis 50 % der analysierten Proben detektiert werden. Bei Untersuchung von Wurzeln mutmaßlich latent infizierter Reben mittels Bakterienanreicherung und nested-PCR lag die Nachweisrate im Frühjahr und Herbst zwischen 33 und 40 %, im Juli bei 20 %. In Trieben dieser Reben war der Anteil positiver Nachweise abhängig von der Vegetationsperiode stark unterschiedlich. Im Jahr 2010 wurde das Pathogen in 41 bis 53 % der Proben gefunden, 2011 aber nur mehr in 0 bis 9,1 %.

Schlagwörter: *Agrobacterium vitis*, Rebe, Mauke, Selektivmedium, latente Infektion, jahreszeitlicher Verlauf, direkte DNA-Präparation

Comparison of PCR-based methods for detection of *Agrobacterium vitis* in grapevines. *Several diagnostic procedures for detection of *Agrobacterium vitis* in grapevine material were compared. Infected and presumably latently infected vines were analyzed. Roots, tumour and shoot samples were collected all year round. DNA was either gained after an enrichment step on a semiselective medium or extracted directly from grapevine tissue. Standard and nested PCR protocols targeting chromosomal genes and Ti-plasmid borne genes were applied. Direct DNA preparation combined with nested PCR permitted the detection of the pathogen at a high rate in roots, shoots and tumours. The method, however, did not allow detection of bacteria in dormant canes. This was only possible by aid of an enrichment step on a selective medium followed by nested PCR. Analysis of infected vines by the latter protocol revealed the presence of the pathogen in 83 to 93 % of tumour samples, in 70 % of the shoot samples collected in autumn and in 80 % of the root samples taken in late spring. During summer low and erratic population densities were observed. In dormant canes the pathogen was identified at a rate of 16.7 to 50 %. An enrichment step followed by nested PCR was also used for examination of symptomless but presumably infected vines. The pathogen was identified in 33 to 40 % of the roots collected in spring or autumn and in 20 % of the roots collected in July. Analysis of shoots revealed considerable differences between years. In 2010 *A. vitis* was identified in 41 to 53 % of the samples, in 2011 only in 0 to 9.1 %.*

Keywords: *Agrobacterium vitis*, grapevine, crown gall, latent infection, selective medium, seasonal course, direct DNA preparation

Les possibilités et les limites de détection de l'Agrobacterium vitis dans les vignes à l'aide de différentes méthodes basées sur la PCR. Les différentes procédures de diagnostic de l'Agrobacterium vitis dans le matériel de vigne ont été comparées. Le matériel des pousses, des racines et des tumeurs des vignes présentant les symptômes et des vignes faisant probablement l'objet d'une infection latente a été analysé pendant différentes saisons. L'ADN bactérienne a été extraite, soit en ajoutant une étape d'enrichissement sur un milieu semi-sélectif, soit directement du tissu des vignes. Les gènes du chromosome bactérien et du plasmide Ti ont été amplifiés au moyen de la PCR simple et nichée (nested-PCR). Le pathogène a pu être détecté dans un grand nombre d'échantillons de pousses, de tumeurs et de racines à l'aide d'une préparation directe d'ADN et de PCR nichée. La détection dans du bois en repos végétatif n'a cependant été possible qu'après enrichissement bactérien sur un milieu sélectif, suivi par une PCR nichée. Cette technique a permis de détecter l'agent pathogène, lors de l'examen de vignes porteuses de symptômes, dans 83 à 93 % des échantillons du matériel tumoral, dans près de 70 % des échantillons du matériel des pousses en automne et dans près de 80 % des échantillons de racines au printemps tardif. En été, on a observé des taux de détection variables et plutôt faibles. En hiver, l'agent pathogène a pu être détecté dans le bois en repos végétatif, selon le moment du prélèvement des échantillons, dans 16,7 % à 50 % des échantillons analysés. Quant à l'analyse des racines de vignes faisant probablement l'objet d'une infection latente au moyen de l'enrichissement bactérien et de la PCR nichée, le taux de détection se situait entre 33 et 40 % au printemps et en automne, et à 20 % en juillet. Dans les pousses de ces vignes, la quote-part des détections positives variait fortement en fonction de la période de végétation. En 2010, le pathogène a été trouvé dans 41 à 53 % des échantillons, mais dans 0 à 9,1 % seulement en 2011.

Mots clés : *agrobacterium vitis*, vigne, broussin, milieu sélectif, infection latente, succession des saisons, préparation directe de l'ADN

Agrobacterium vitis, der Erreger der Mauke an Weinreben, ist in vielen Teilen der Welt weit verbreitet. Das Bakterium ist in der Lage, lange Zeit latent und somit unerkannt in den Pflanzen zu überdauern (BURR und OTTEN, 1999). Es besteht deshalb ein großes Risiko, dass latent infiziertes Rebmaterial für die Vermehrung verwendet und der Erreger dadurch verbreitet wird. Sind die Bedingungen für den Erreger günstig, wie beispielsweise bei Verletzungen des Rebstockes, kommt es zur Vermehrung der Bakterien und zur Bildung von Tumoren. Häufig werden solche Verletzungen durch Winterfröste hervorgerufen, die Mauke ist deshalb in erster Linie eine Krankheit kühlerer Weinbaugebiete. Die Tumore bilden sich bevorzugt an der Stammbasis, manchmal aber auch an den Wurzeln oder am Stamm selbst. Große Tumore stören oder verhindern die Ausbildung eines leistungsfähigen Leitbündelsystems und können insbesondere junge Reben zum Absterben bringen. Aber auch kleinere, lokale Tumore beeinträchtigen den Stofftransport und verringern so dauerhaft die Leistungsfähigkeit der Rebe. Bei Veredlung von symptomtragendem Pflanzenmaterial treten häufig Wucherungen an der Veredlungsstelle auf. Weiters führen Infektionen mit *A. vitis* zu Läsionen an den Wurzeln. Sie reduzieren so möglicherweise auch ohne Tumorbildung die Wüchsigkeit der Reben.

Die tumorinduzierenden Gene befinden sich auf einem Plasmid, dem Ti-(tumor inducing) Plasmid. Bakterienstämme, denen so ein Plasmid fehlt, sind

nicht pathogen. Ein Teil der Ti-Plasmid-DNA wird von der Bakterienzelle in die Pflanzenzelle eingeschleust und in die pflanzliche DNA integriert. Dadurch kommt es zur Umwandlung der Pflanzenzellen in sich unkontrolliert vermehrende Tumorzellen. Die Plasmid-DNA codiert unter anderem die Bildung von Opinen, Derivaten von Aminosäuren, die den Bakterien als Nahrung dienen. Je nach Art des produzierten Opins werden bei *A. vitis* Ti-Plasmide vom Octopin/Cucumopin-, Nopalin- oder Vitopin-Typ unterschieden. Am häufigsten treten Stämme auf, die ein Ti-Plasmid vom Octopin/Cucumopin-Typ enthalten, etwa 60 bis 75 % aller untersuchten Isolate gehören zu diesem Typ, 20 bis 30 % gehören zum Nopalin-Typ und 5 bis 10 % zum Vitopin-Typ (OTTEN et al., 2008; BURR et al., 1998; BURR und OTTEN, 1999). Normalerweise wird Mauke an Reben durch *A. vitis* hervorgerufen, es gibt jedoch auch Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*, die dieses Schadbild hervorrufen (SZEGEDI et al., 2005).

Wirksame, direkte Strategien zur Bekämpfung der Mauke sind nicht bekannt. Die Verwendung von pathogenfreiem Ausgangsmaterial ist daher eine wesentliche Voraussetzung zur Erzielung gesunder Rebestände.

Derzeit existieren verschiedene Ansätze zur Labordiagnose latenter Infektionen. In vielen Fällen erfolgt als erster Schritt aus dem zu testenden Material eine Bakterianreicherung auf einem semiselektiven Nährmedium (BRISBANE und KERR, 1983; BINI et al., 2008).

Eine Präparation von Bakterien-DNA direkt aus Pflanzenmaterial wurde ebenfalls beschrieben. (EASTWELL et al., 1995; PEDUTO et al., 2010). Der eigentliche Nachweis wird heute üblicherweise mittels PCR durchgeführt. Dazu wurde eine Reihe von Methoden veröffentlicht, die verschiedene DNA-Sequenzen von Virulenzgenen am Ti-Plasmid bzw. im Bakterienchromosom amplifizieren. Diese PCR-Analysen können als einfache PCR-Verfahren erfolgen, es wurden kürzlich jedoch auch nested-PCR-Verfahren publiziert (PEDUTO et al., 2010).

Nachweistechiken, die eine Bakterienanreicherung auf Nährmedien beinhalten, sind zeitaufwendig, direkte Nachweise aus Pflanzenmaterial mittels PCR können durch PCR-Inhibitoren im Probematerial beeinträchtigt werden. Eine generell geringe Bakterienzahl in latent infiziertem Material sowie saisonale Schwankungen der Verteilung des Bakteriums in den Pflanzenorganen können überdies den Erfolg aller Nachweismethoden beeinträchtigen (OTTEN et al., 2008).

Ein massives Auftreten von Maukesymptomen nach tiefen Wintertemperaturen konnte von den Autoren in der Vegetationsperiode 2010 im Raum Niederösterreich beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in den besagten Gebieten von GANGL et al. (2006 und 2008) mittels Laboruntersuchung nur ganz vereinzelt *A. vitis* nachgewiesen. Sie führten die geringe Nachweishäufigkeit allerdings bereits damals nicht unbedingt auf die geringe Verbreitung der Mauke, sondern unter anderem auf Schwierigkeiten beim Nachweis von Latentinfektionen zurück.

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich unterschiedlicher Verfahren zum Nachweis von *A. vitis* in Rebmateriale. Weiters sollte ermittelt werden, ob der Einsatz dieser Verfahren eine zuverlässige Diagnose von latenten Infektionen ermöglicht. Zudem sollte festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt im Jahr an welchen Pflanzenteilen Untersuchungen am sinnvollsten sind.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Alle verwendeten Pflanzenproben stammten aus vier maukekranken Weingärten in Niederösterreich. Probenahmen erfolgten regelmäßig von Juli 2010 bis August 2011.

Zeigt eine Rebe erst einmal Maukesymptome, ist eine Laboruntersuchung letztlich überflüssig. Ziel einer guten Labormethode muss es sein, Latentinfektionen zu detektieren. Deshalb wurden die Analysen sowohl an sicher infizierten als auch an (mutmaßlich) latent infizierten Reben durchgeführt. Die untersuchten Reben wurden in zwei Testgruppen eingeteilt:

Variante 1 – sicher mit *A. vitis* infizierte Reben: In jedem Weingarten wurden aufgrund einer visuellen Bonitur zehn symptomtragende Reben ausgewählt und markiert.

Variante 2 – mutmaßlich latent infizierte Reben: Jeweils die Nachbarstöcke der tumortragenden Reben in Variante 1 wurden ebenfalls visuell beurteilt und markiert. Ob diese tatsächlich latent infiziert waren bzw. welcher Anteil dieser Reben das Bakterium enthielt, war zu Beginn der Arbeit allerdings nicht bekannt.

Beprobt wurden bei beiden Varianten Wurzeln, Triebe sowie, falls vorhanden, Tumorgewebe. Rund 5 cm lange Pflanzenteile wurden mittels Rebschere oder Messer entnommen und gekühlt ins Labor transportiert.

Folgende Laborverfahren wurden miteinander verglichen:

A: Gewinnung der bakteriellen DNA nach Anreicherung auf Semiselektivmedium, einfache PCR-Amplifikation.

B: Gewinnung der bakteriellen DNA nach Anreicherung auf Semiselektivmedium, nested-PCR-Amplifikation.

C: Gewinnung der bakteriellen DNA direkt aus pflanzlichem Gewebe mittels CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode, nested-PCR-Amplifikation.

Die Untersuchung umfasste etwa 450 Pflanzenproben.

Gewinnung der bakteriellen DNA nach Anreicherung auf Semiselektivmedium

Die Pflanzenproben wurden in Scheiben geschnitten, mit den Schnittflächen nach unten auf 3DG Semiselektivmedium (Na-Tartrat 5,75 g/l; D-Glutaminsäure 0,6 g/l; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 5,52 g/l; Na_2HPO_4 4,26 g/l; NaCl 5,94 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 0,24 g/l; Na-Taurocholat 0,3 g/l; Hefeextrakt 0,02 g/l; Kongorot 0,025 g/l; Actidion 0,2 g/l; BRISBANE und KERR, 1983) gelegt. Um die Selektivität zu erhöhen, wurden dem Medium 70 mg/l K_2TeO_3 zugesetzt (anstelle des von BRISBANE und KERR (1983) eingesetzten Selenits;

MOUGEL et al., 2001). Nach 4 Tagen Inkubation bei 28 °C wurde eine Impföse der Bakterienkultur in 200 µl Zellaufschlusspuffer (1 % Triton X 100 (v/v), 0,25 % NaN₃ (w/v)) suspendiert, 5 min bei 95 °C im Thermomixer aufgeschlossen und auf Eis gestellt. Erhitzung und Abkühlung wurden noch einmal wiederholt (ABOLMAATY et al., 2000; SZEGEDI und BOTTKA, 2002).

Extraktion der bakteriellen DNA direkt aus pflanzlichem Gewebe mittels CTAB-Methode

Rund 100 mg Pflanzenmaterial wurden mit 800 µl Extraktionspuffer (2 % Cetyltrimethylammoniumbromid = CTAB (w/v), 1,4 M NaCl, 0,2 % Mercaptoethanol (v/v), 20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8) unter Verwendung von flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben. Die Proben wurden bei 60 °C für 20 min inkubiert und anschließend 1 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer gleichen Menge an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem gleichen Volumen an Isopropanol gemischt und 30 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Reinstwasser gelöst (MAIXNER et al., 1995).

PCR-Nachweise

Einfach-PCR: Für den Nachweis wurden das am Chromosom lokalisierte CG49 Polygalacturonase-Gen aller *A. vitis*-Stämme (Primer PGF/PGR) und das am Ti-Plasmid lokalisierte Vir E2-Gen von Octopin- und Nopalin-Stämmen verwendet (Primer VirE2PF/VirE2PR; SZEGEDI und BOTTKA, 2002). Um die in den untersuchten Anlagen vorkommenden Bakterienstämme hinsichtlich des Ti-Plasmids zu charakterisieren, wurden spezifische Primer für das Tm4 its- und das S4 6b/vis-Gen eingesetzt (SCHULTZ et al., 1993). Nested-PCR: Es erfolgte einerseits eine Amplifikation des pehA-Gens (ebenso aus dem CG49 Polygalacturonase-Gen mittels der Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3; EASTWELL et al., 1995; PEDUTO et al., 2010), das alle *Agrobacterium vitis*-Stämme enthalten. Andererseits wurden Sequenzen aus der am Ti-Plasmid befindlichen virA-Region (Primer NVirA fw/NVirA rw; StVirA fw/StVirA Rw; EASTWELL et al., 1995; PEDUTO et al., 2010) zur Diagnose herangezogen. Für die PCR waren in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Reaktion enthalten: Je 0,5 µM forward und reverse

Primer, 200 µM dNTPs, 0,5 U Top-Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) 1x Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland). Im Falle von DNA-Präparationen nach Bakterienanreicherung wurde 1 µl pro Reaktionsansatz eingesetzt, bei DNA-Präparationen direkt aus Pflanzenmaterial 5 µl, in der zweiten Runde der nested-Ansätze 0,1 µl. Die PCR erfolgte in 40 Zyklen von 45 s Denaturierung bei 94 °C, 45 s Annealing bei einer Temperatur etwa 10 °C unter den Schmelzpunkten der jeweiligen Primer sowie 60 s Extension bei 72 °C in einem Eppendorf Mastercycler (Hamburg, Deutschland). Die PCR-Produkte wurden auf 1,5 % Agarosegelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

Ergebnisse

In Rebteilen von allen vier untersuchten Anlagen wurde das Ti-Plasmid vom Octopin/Cucumopin-Typ festgestellt. Andere Ti-Plasmid-Typen wurden nicht gefunden. Visuelle Bonituren ergaben, dass keine der im Jahr 2010 Symptome zeigenden Reben im Frühjahr/Sommer 2011 frische Maukesymptome aufwies. Die im Jahr 2010 sichtbaren Tumore waren im Folgejahr eingetrocknet oder abgefallen. 2011 lagen somit nur mehr Latentinfektionen vor.

Methodenvergleich

Um die Eignung unterschiedlicher Methoden zum Nachweis von *A. vitis* auszutesten, wurden symptomtragende und mutmaßlich infizierte Reben mittels unterschiedlicher Methoden parallel analysiert. Die Ergebnisse für bekanntermaßen infizierte Reben (Variante 1) sind in Abbildung 1 dargestellt. Im Jahr 2010 wurden das Verfahren A (einfach PCR-Analyse, Primer PGF/PGE, mit Anreicherungsschritt) und das Verfahren C (direkte DNA-Präparation und nested-PCR, Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3) miteinander verglichen. Mit Ausnahme eines Probenahmetermins (17. 7. 2010) waren die Ergebnisse beider Methoden ähnlich. Im Jahr 2011 wurden die Verfahren B (Bakterienanreicherung, nested-PCR Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3) und C eingesetzt. In diesem Jahr wurden nur Triebproben untersucht. Ein Nachweis im Winter aus ruhendem Holz gelang nur mit Methode B. In unseren weiterführenden Untersuchungen wurde mit einem Bakterienanreicherungsschritt vor der nested-PCR-Analyse (Methode B) gearbeitet.

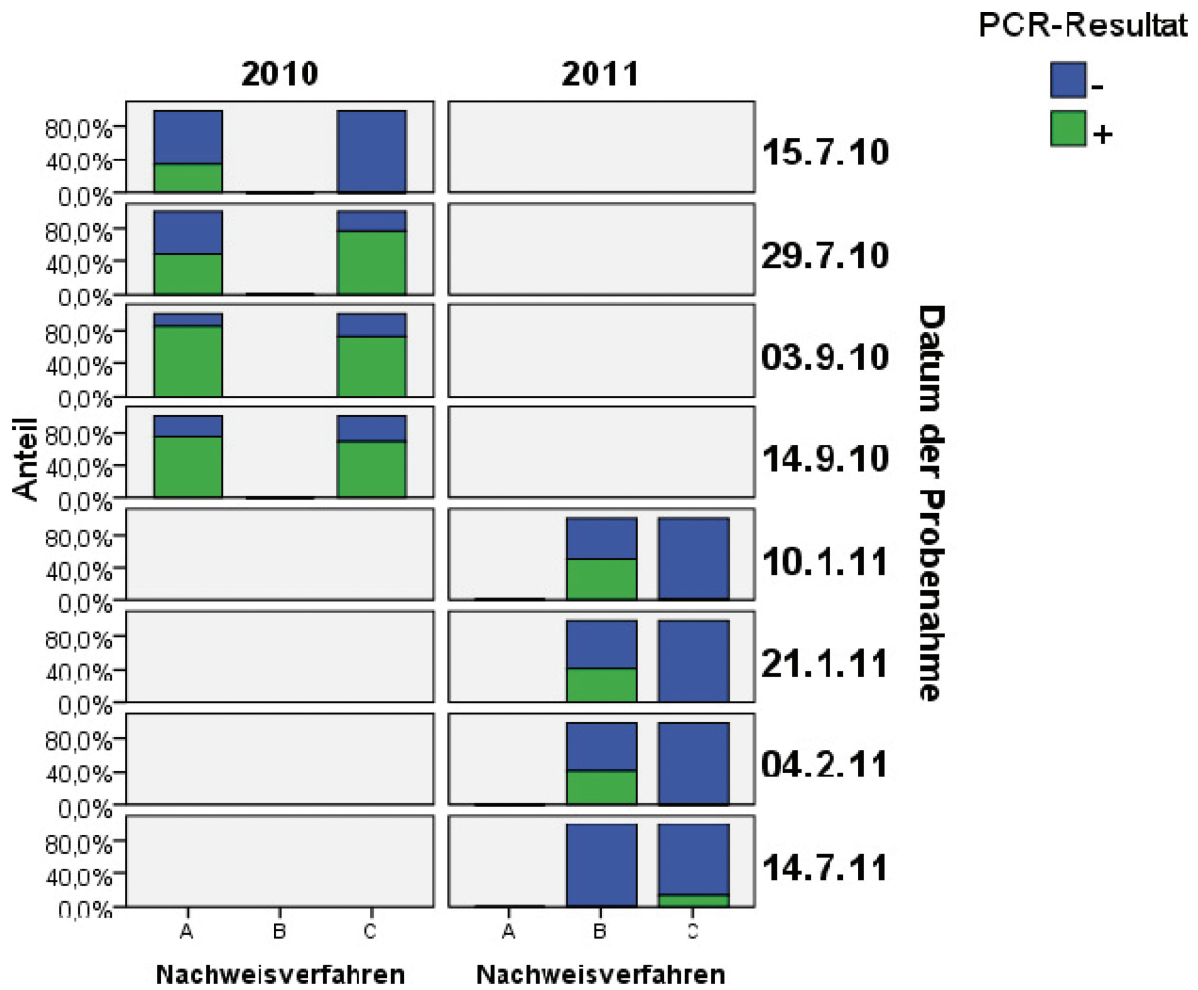


Abb. 1: Vergleich der unterschiedlichen Verfahren zum Nachweis von *A. vitis* in sicher infiziertem Rebmaterial in den Jahren 2010 (Reben wiesen junge Tumore auf) und 2011
 Nachweisverfahren A: Bakterienanreicherung auf Selektivmedium, Präparation der bakteriellen DNA durch zweimaliges Einfrieren und Aufkochen, einfach-PCR (Primer PG); Nachweisverfahren B: Bakterienanreicherung auf Selektivmedium, Präparation der bakteriellen DNA durch zweimaliges Einfrieren und Aufkochen, nested-PCR (Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3); Nachweisverfahren C: Gewinnung der bakteriellen DNA direkt aus pflanzlichem Gewebe mittels CTAB-Methode, nested-PCR-Amplifikation (Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3)

Weiters wurde unter Verwendung des Verfahrens B ein Vergleich von nested-PCRs mit unterschiedlichen Primern durchgeführt. Die Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3 amplifizierten Sequenzen aus dem Polygalacturonasegen (pehA), die Primer NVirAfw/NVirArev und StVirAfw/StVirArev das VirA Gen auf dem Ti-Plasmid. Sowohl symptomtragende als auch symptomfreie Reben wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Im Fall von PCR-negativen Proben stimmten bei Analyse von Triebmaterial 86,5 % der Resultate überein, bei Wurzelmaterial 100 %. Dage-

gen gab es viele Fälle, in denen das Bakterium in einem der beiden PCR-Ansätze gefunden wurde, im anderen aber nicht. Die Übereinstimmung betrug zwischen 42 % bei Triebmaterial und 57 % bei Wurzeln.

Nachweisbarkeit von *A. vitis* zu unterschiedlichen Jahreszeiten und aus unterschiedlichen Rebteilen

Die Analysenergebnisse für symptomtragende Reben (Variante 1) sind in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt. An Trieben ließ sich das Pathogen am bes-

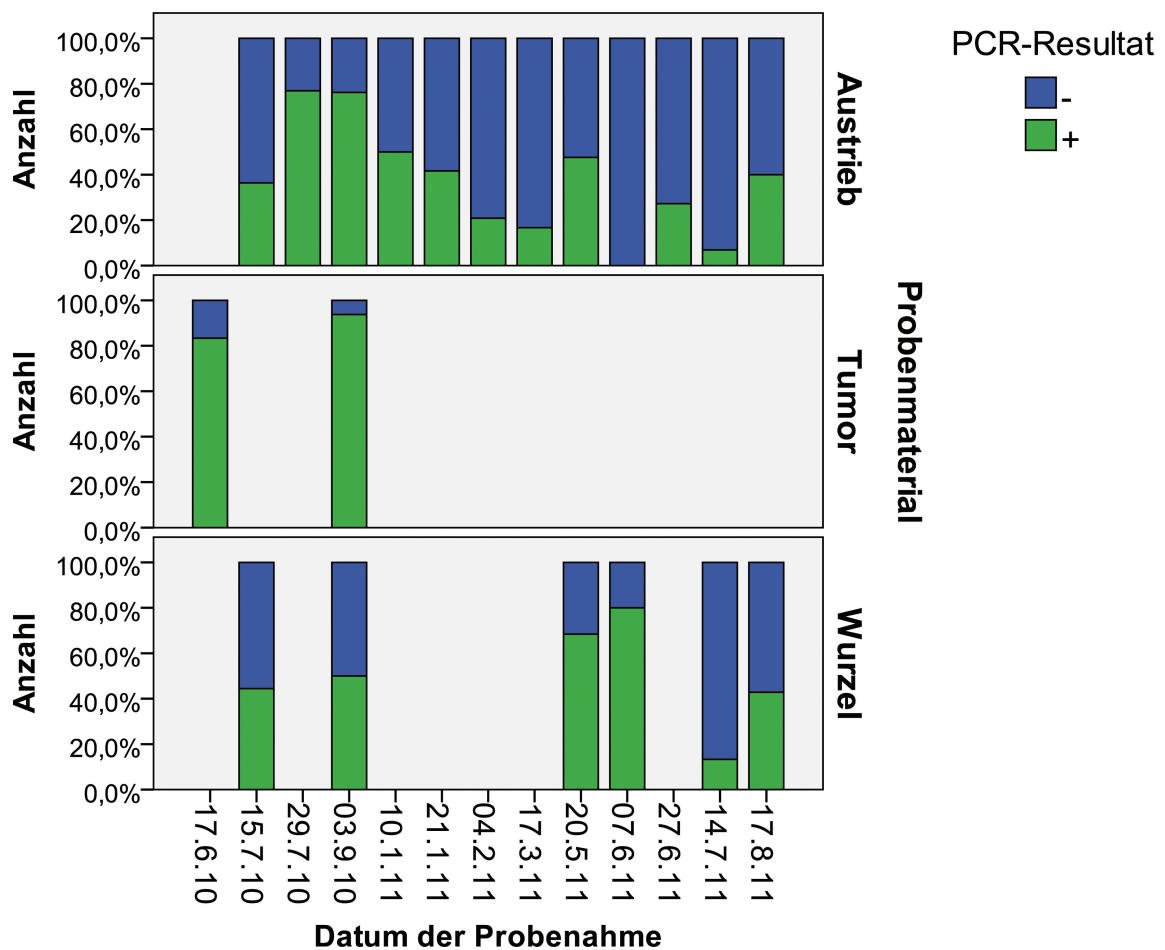
Tab. 1: Gegenüberstellung der nested-PCR-Ergebnisse bei Amplifikation unterschiedlicher Bakteriengene

| Probenmaterial | | StVirA | |
|----------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | | negativ | positiv |
| (Aus-)Trieb | pehA negativ | 86,5 % (45 Proben) | 13,5 % (7 Proben) |
| | pehA positiv | 42,1 % (8 Proben) | 57,9 % (11 Proben) |
| Wurzel | pehA negativ | 100 % (6 Proben) | 0 % (0 Proben) |
| | pehA positiv | 57,1 % (16 Proben) | 42,9 % (12 Proben) |

pehA: Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3 amplifizierten Sequenzen aus dem Polygalacturonasegen.
 StVirA: Primer NvirAfw/NvirArev und StVirAfw/StVirArev amplifizierten Sequenzen aus dem VirA Gen.

Abb. 2: PCR-Ergebnisse von sicher infizierten Proben (Variante 1) zu unterschiedlichen Zeitpunkten und aus verschiedenen Rebsorten; alle Nachweise erfolgten mittels Bakterienanreicherung und nested-PCR (Methode B; Primer pehA/pehA1, pehA2/pehA3).

ten im Herbst 2010 nachweisen (in etwa 70 % der Proben). Zu diesem Zeitpunkt waren frische Tumore an den Reben vorhanden. Im ruhenden Holz im Winter betrug die Nachweisrate 16,7 % bis 50 %. In der Saison 2011 waren die Reben nur mehr latent infiziert. Der Nachweis in den Trieben gelang am besten im Mai (in 47,6 % der Proben) und in der zweiten Augushälfte (40 % der Proben). Im Sommer waren die Nachweisraten schwankend und vergleichsweise gering. Aus Tumormaterial wurde der Erreger zu 83 bis 93 % diagnostiziert. Die höchste Nachweisrate an Wurzeln ergab sich bei den Probenahmen im Spätfrühling (Mai, Juni). Zu diesem Zeitpunkt wurde *A. vitis* in bis zu 80 % der Proben identifiziert. Im Sommer war das Bakterium in Wurzeln deutlich schlechter detektierbar, im Herbst wurde wieder ein Anstieg der Nachweisrate (in beiden Versuchsjahren auf etwa 40 %) beobachtet. In Abbildung 3 sind die Analysenergebnisse für die mutmaßlich



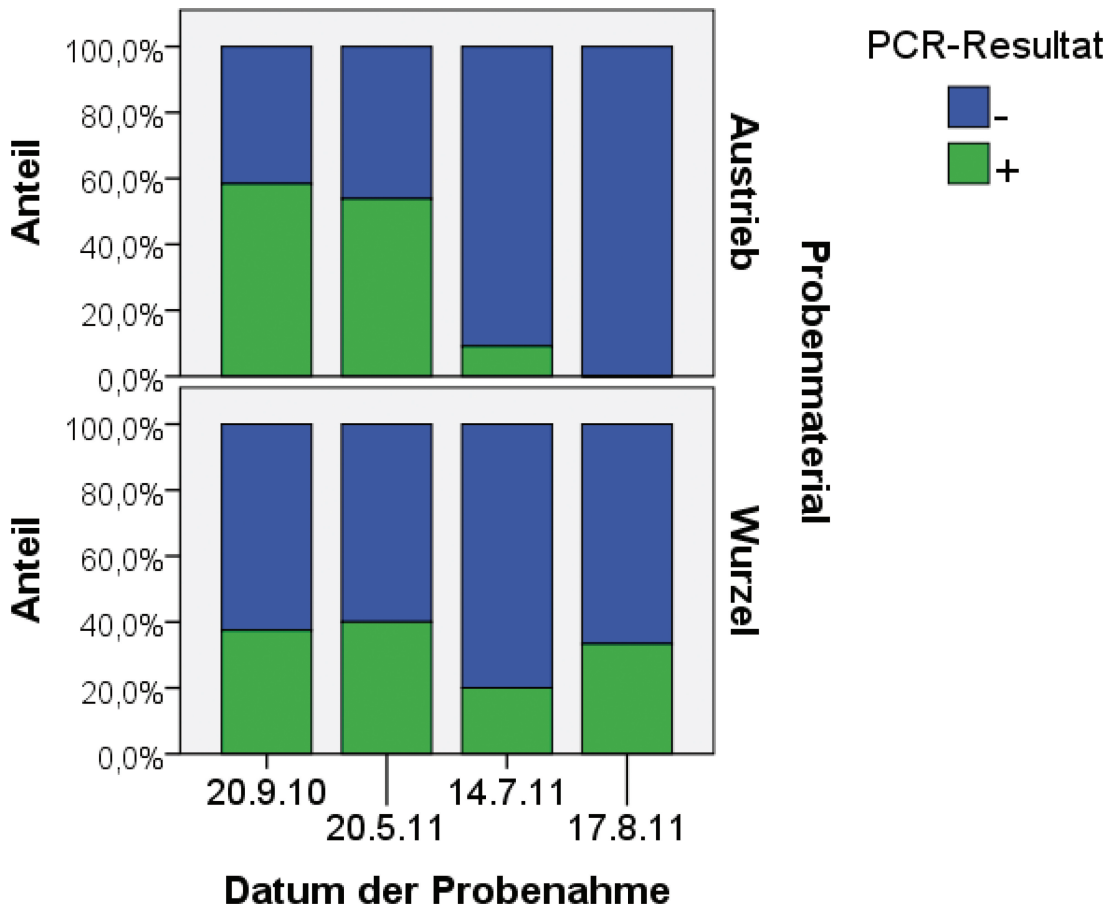


Abb. 3: PCR-Ergebnisse von mutmaßlich latent infizierten Proben (Nachbarstöcke von symptomtragenden Reben) zu unterschiedlichen Zeitpunkten und aus verschiedenen Rebteilen (Verfahren B, Bakteriananreicherung auf Semiselektivmedium, nested-PCR mittels Primern pehA/pehA1, pehA2/pehA3)

latent infizierten Nachbarstöcke der symptomtragenden Reben (Variante 2) dargestellt. An Trieben lag je nach Datum der Probenahme der Anteil an Reben, in denen das Bakterium festgestellt wurde, im Herbst 2011 und Frühjahr 2011 bei 41 bis 53 %, im Sommer 2011 nur mehr bei 0 bis 9,1 %. Aus Wurzeln war der Erreger immer zu einem gewissen Prozentsatz nachweisbar, dieser lag im Frühjahr und Herbst zwischen 33 und 40 %, im Juli bei 20 %.

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die höchste Rate an erfolgreich nachgewiesenen Bakterieninfektionen mit Hilfe von Methode B (Anreicherung auf Selektivmedium, gefolgt von einer nested-PCR) erzielt. Gleichzeitig war dieses Verfahren allerdings

auch das zeitaufwendigste. Es erforderte eine Kultivierung auf einem Nährboden über mehrere Tage und die Durchführung von zwei PCR-Ansätzen. Bei Methode C (direkte Präparation der bakteriellen DNA aus Pflanzengewebe mittels CTAB) entfiel die Zeit für das Ankultivieren der Bakterien. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, wurde im Jahr 2010 auch mit Methode C in einem hohen Anteil an symptomtragenden Reben das Bakterium nachgewiesen. Im Winter 2011 konnten mit dieser Methode aus ruhendem Holz allerdings keine positiven Nachweise geführt werden. Vermutlich lagen im ruhenden Holz der Bakterientiter niedriger und der Gehalt an Substanzen, die die Polymerase in der PCR hemmen (phenolische Verbindungen und Polysaccharide), höher. Ebenso könnte ein höherer Hemmstoffgehalt in Wurzeln in einigen Fällen einen positiven Bakteriennachweis mittels Methode C verhindert haben. Auch SZEGEDI und BOTTKA (2002)

kommen in ihrer Arbeit zu dem Schluss, dass eine Vorkultivierung der Bakterien auf einem Semiselektivmedium die Verlässlichkeit des Nachweises erhöhen könnte, weil dieser Schritt Polymerase-Inhibitoren eliminiert, die in CTAB-Präparationen vorhanden sind. Weiters wurden zwei unterschiedliche Gene, nämlich das Polygalacturonasegen aus dem Bakterienchromosom und das VirA Gen auf dem Ti-Plasmid mittels nested-PCR amplifiziert. Ein Vergleich der beiden Verfahren zeigte, dass die negativen Ergebnisse fast immer übereinstimmend mit beiden Primern erzielt werden konnten. Dagegen gab es eine verhältnismäßig hohe Anzahl an Proben, in denen das Bakterium in der einen Analyse gefunden wurde, in der anderen aber nicht (Tab. 1). Dafür kommen mehrere Ursachen in Frage. Nicht in allen Fällen enthält *A. vitis* ein Ti-Plasmid. Manche Stämme oder auch einzelne Isolate enthalten keines oder haben es verloren. Ein Nachweis des am Bakterienchromosom gelegenen PG Gens erfasst (fast) alle Stämme von *A. vitis* (EASTWELL et al., 1995; BURR und OTTEN, 1999; SZEGEDI und BOTTKA, 2002). Dieser Nachweis wird ein positives PCR-Signal ergeben, auch wenn das Ti-Plasmid fehlt und der Stamm oder das Isolat deswegen nicht pathogen ist. In seltenen Fällen könnte in Reben ein Stamm von *Agrobacterium tumefaciens* vorhanden sein, der ein Ti-Plasmid enthält. In diesem Fall würde nur die auf Amplifikation des VirA Gens zielende PCR ein positives Signal geben, eine Amplifikation des PG Gens würde nicht stattfinden. In unserer Untersuchung wurden in allen untersuchten Weingärten pathogene, also das Ti-Plasmid enthaltende Stämme von *A. vitis* nachgewiesen. Es hat deshalb den Anschein, dass nicht nur genetische Unterschiede für die mangelnde Übereinstimmung verantwortlich sind. Eine DNA-Vorbereitung für die PCR durch Einfrieren und Auftauen der Bakteriensuspension entfernt Hemmstoffe (z. B. Polysaccharide) möglicherweise in Einzelfällen nicht ausreichend. Weiters ist der Anteil an Ziel-DNA in vielen Proben gering. Dieser könnte in einer PCR-Reaktion zwar gerade nachweisbar sein, in der nächsten aber unter der Nachweisgrenze liegen.

Aus Abbildung 2 geht hervor, dass der Nachweis von *A. vitis* am leichtesten aus Tumorgewebe zu führen ist. In fast allen Tumoren wurde der Erreger nachgewiesen, offensichtlich gibt es fast in jedem Tumorgewebe ausreichend Bakterien. In austreibenden Trieben wurden in der Vegetationsperiode 2010 deutlich mehr Reben (zu einigen Terminen mehr als 70 %) als bakterieninfiziert erkannt als 2011 (maximal 47,6 %). Es hat den Anschein, dass ein Vorhandensein von fri-

schen Tumoren in den oberirdischen Rebscheiden mit einem höheren Bakterientiter und möglicherweise auch einer zumindest annähernd systemischen Verteilung der Bakterien einhergeht. Sind die Bedingungen für die Tumorbildung und hohe Bakterientiter in der Pflanze dagegen weniger günstig wie 2011, fällt die Bakterienkonzentration in den Trieben offensichtlich stark ab oder die Erreger sind nur mehr lokal vorhanden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Analyse der Reben aus Variante 2 (mutmaßlich latent infizierte Reben; Abb. 3). 2010, in einem Jahr mit starker Vermehrung von *A. vitis*, war die Chance auf erfolgreichen Nachweis in Trieben relativ gut (bis 53 %). 2011, in einem offensichtlich für die Bakterienvermehrung nicht so günstigen Jahr, war das Bakterium im Austrieb kaum nachweisbar.

In Wurzeln symptomtragender Reben (Variante 1) dagegen konnte der Erreger auch 2011 mit einer Rate von bis zu 80 % festgestellt werden. In Wurzeln mutmaßlich latent infizierter Reben (Variante 2) wurde das Pathogen sowohl im Herbst 2010 als auch im Frühjahr 2011 in etwa 40 % der Proben gefunden. Das ist eine bemerkenswerte Nachweisrate, weil der tatsächliche Bakterienstatus dieser Reben nicht bekannt ist. Es handelt sich ja um symptomfreie Nachbarstöcke symptomtragender Reben. Manche von ihnen könnten auch bakterienfrei sein.

Am leichtesten ließ sich das Pathogen sowohl in Trieben als auch in Wurzeln im Spätfrühling (Ende Mai) und im Herbst (September) nachweisen. Im Sommer waren sowohl in Trieben als auch in Wurzeln vergleichsweise geringe und auch stark schwankende Nachweiserfolge zu verzeichnen. Dafür kommen mehrere Gründe in Frage. Möglicherweise verdünnt sich besonders im Austrieb in Phasen intensiven Wachstums die Bakterienkonzentration so sehr, dass ein positiver Nachweis nicht mehr möglich ist. Erfolgt der Nachweis unter Einbeziehung eines Anreicherungs-schrittes, könnten auch andere die Rebe besiedelnde Bakterienarten eine Rolle spielen. In unserem Fall hatte es immer wieder den Anschein, dass insbesondere Pseudomonaden das Wachstum von *A. vitis* auf den Nährböden beeinträchtigten wenn nicht gar unterdrückten (Daten nicht gezeigt). Auch BAUER et al. (1994) demonstrierten in ihren Arbeiten, dass die Konzentration von *A. vitis* in Rebtrieben im Sommer deutlich geringer ist als im Frühjahr und im Herbst. Als mögliche Ursache nannten die Autoren physiologische Veränderungen in den Rebtrieben. Sie beschrieben einen zeitlichen Zusammenfall zwischen Zuckergehalt in den Rebtrieben und Bakterientiter. So könn-

ten Schwankungen des Glucosegehaltes (geringe Gehalte im Sommer) oder aber andere mit dem Zuckergehalt der Rebe korrelierende Parameter die Ursache für geringere Bakterientiter im Sommer darstellen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass der Nachweis von latenten Infektionen von *A. vitis* mit Hilfe von Methode B (Anreicherung auf Selektivmedium, gefolgt von einer nested-PCR) möglich ist. Mit etwas geringerer Nachweissicherheit ist während der Vegetationszeit auch der Einsatz von Methode C (direkte DNA-Präparation und nested-PCR) möglich. Um latente Infektionen in Vermehrungsbeständen oder Pflanzmaterial (Pfropfreben) mit einer hohen Sicherheit zu erkennen, ist die Durchführung mehrerer Analysen sinnvoll. Dazu sollten im Frühjahr oder Herbst mehrfach Wurzel- und eventuell auch Triebproben gezogen und mittels mehrerer PCR-Analysen (Amplifikation von Genen aus dem Bakterienchromosom und vom Ti-Plasmid) untersucht werden.

Literatur

- ABOLMAATY, A., VU, C., OLIVIER J. and LEVIN, R.E. 2000: Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios.* 101: 181-189
- BAUER, C., SCHULZ, T.F., LORENZ, D., EICHHORN, K.W. and PLAPP, R. 1994: Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the period. *Vitis* 33: 25-29
- BINI, F., KUCZMOG, A., PUTNOKY, P., OTTEN, L., BAZZI, F., BURR, T.J. and SZEGEDI, E. 2008: Novel pathogen specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47: 181-189
- BRISBANE, P.G. and KERR, A. 1983: Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 425-431
- BURR, T.J., BAZZI C., SÜLE S. and OTTEN, L. 1998: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease* 82: 1288-1297
- BURR, T.J. and OTTEN, L. 1999: Crown gall of grape: biology and disease management. *Ann. Rev. Phytopathol.* 37: 53-80
- EASTWELL, K.C., WILLIS, L.G. and CAVILEER, T.D. 1995: A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease* 79: 822-827
- GANGL, H., LEITNER, G. und TIEFENBRUNNER, W. 2006: Rebschädigende Viren, Bakterien und bodenbürtige Vektoren in den donauanahen österreichischen Weinbaugebieten zwischen Krems und Wien. *Mitt. Klosterneuburg* 56: 116-123
- GANGL, H., LEITNER, G. und TIEFENBRUNNER, W. 2008: Rebschädigende Viren, Bakterien und bodenbürtige Vektoren im Weinviertel und anderen österreichischen Weinbaugebieten. *Mitt. Klosterneuburg* 58: 35-48
- MAIXNER, M., AHRENS, U. and SEEMÜLLER, E. 1995: Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Europ. J. Plant Pathol.* 101: 241-250
- MOUGEL, C., COURNOYER, B. and NESME, X. 2001: Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 65-74
- OTTEN, L., BURR, T. and SZEGEDI, E. (2008): *Agrobacterium* a disease causing bacterium. In: TZFIRA, T. and CITOVSKY, V. (eds.): *Agrobacterium, from biology to biotechnology.* p. 2-46. – New York: Springer, 2008
- PEDUTO, F., MARCHI, G. and SURICO, G. 2010: Indexing *Agrobacterium vitis* in asymptomatic grapevine propagation material by two nested PCR assays. *Am. J. Enol. Vitic.* 61: 102-112
- SCHULTZ, T.F., LORENZ, D., EICHHORN, K.W. and OTTEN, L. 1993: Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains. *Vitis* 39: 179-182
- SZEGEDI, E. and BOTTKA, S. 2002: Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis* 41: 37-42
- SZEGEDI, E., BOTTKA, S., MIKULAS, J., OTTEN, L. and SULE, S. 2005: Characterisation of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis* 44: 49-54

Eingelangt am 13. Dezember 2011