

Clovis Douanla-Meli<sup>1</sup>, Eva Fornefeld<sup>1</sup>, Peter Baufeld<sup>1</sup>, Yvonne Becker<sup>2</sup>, Kerstin Flath<sup>3</sup>, Monika Götz<sup>4</sup>, Christoph Hoffmann<sup>5</sup>, Björn Hoppe<sup>1</sup>, Wilhelm Jelkmann<sup>5</sup>, Stephan König<sup>1</sup>, Maximilian Lorbeer<sup>1</sup>, Wolfgang Maier<sup>2</sup>, Michael Maixner<sup>5</sup>, Ernst Pfeilstetter<sup>1</sup>, Anna Pucher<sup>3</sup>, Janett Riebesehl<sup>4</sup>, Bernhard Carl Schäfer<sup>1</sup>, Quentin Schorpp<sup>4</sup>, Hana Tlapák<sup>3</sup>, Stefan Wagner<sup>4</sup>, Annette Wensing<sup>5</sup>, Heiko Ziebell<sup>2</sup>, Kerstin Zikel<sup>5</sup>, Florian Bittner<sup>6</sup>

## Diagnose von Quarantäneschadorganismen am Julius Kühn-Institut im nationalen Referenzlaboratorium für Schadorganismen der Pflanzen

Diagnosis of quarantine organisms at the JKI in the National Reference Laboratory for organisms harmful to plants

404

### Zusammenfassung

Dem JKI wurde im April 2019 durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) die Funktion des nationalen Referenzlaboratoriums (NRL) für Schadorganismen der Pflanzen zugewiesen. Mit dieser Funktion des NRL für Deutschland sind bestimmte Zuständigkeiten und Aufgaben verbunden, die in der EU-Verordnung 2017/625 (EU, 2017) geregelt sind. Dazu gehören auch Referenzuntersuchungen bzw. die Diagnose von Quarantäneschadorganismen (QSO). Das NRL stellt eine übergeordnete Einheit innerhalb des JKI dar. Durch insgesamt 14 Prüflabore der JKI-Institute für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland (A), nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit (AG), Epidemiologie und Pathogendiagnostik (EP), Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst (GF), Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau (OW) wird die Referenzfunktion bei der Diagnose zu verschiedensten (Qua-

rantäne)-Schadorganismen der Pathogengruppen Bakterien, Insekten, Nematoden, Pilze (einschließlich Oomyceten), Phytoplasmen und Viren wahrgenommen.

**Stichwörter:** Quarantäneschadorganismen, Pflanzengesundheit, Pathogen-Diagnose, Nationales Referenzlaboratorium (NRL)

### Abstract

In April 2019, the JKI was officially designated as the National Reference Laboratory (NRL) for organisms harmful to plants by the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL). This function as NRL for Germany is associated with certain responsibilities and tasks, which are specified in the EU Regulation 2017/625 (EU, 2017). This also includes reference tests and the diagnosis of quarantine pests, respectively. The NRL represents a

### Affiliationen

<sup>1</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Nationale und Internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Braunschweig

<sup>2</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

<sup>3</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Kleinmachnow

<sup>4</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Braunschweig

<sup>5</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Dossenheim

<sup>6</sup> Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Leitung, Quedlinburg

### Kontaktanschrift

Dr. Clovis Douanla-Meli, Julius Kühn-Institut (JKI) – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Nationale und Internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig, E-Mail: clovis.douanla-meli@julius-kuehn.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

3. Juli 2020

superordinate unit inside JKI. A total of 14 test laboratories from different JKI institutes, namely for Plant Protection in Field Crops and Grassland (A), for National and International Plant Health (AG), for Epidemiology and Pathogen Diagnostics (EP), Plant Protection in Horticulture and Forests (GF), and for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture (OW) are in charge to carry out a reference function in the diagnosis of (quarantine) pests in the pathogen groups of bacteria, fungi (including oomycetes), insects, nematodes, phytoplasma und viruses.

**Key words:** Quarantine Pests, Plant Health, Pathogen Diagnosis, National Reference Laboratory (NRL)

### 1 Zuständigkeiten und Aufgaben des Nationalen Referenzlaboratoriums (NRL) für Schadorganismen der Pflanzen in Deutschland

Im Bereich der Pflanzengesundheit wurden mit der Pflanzengesundheitsverordnung (EU) 2016/2031 (EU, 2017) und der Kontrollverordnung (EU) 2017/625 (EU, 2017) die zentralen Gesetzesgrundlagen auf EU-Ebene neu geregelt. Dies beinhaltet, dass in der EU auf nationaler und internationaler Ebene nun – vergleichbar mit dem Bereich der Tierseuchenerreger – Referenzlabore für Schadorganismen der Pflanzen benannt werden. Die Kriterien für die Ernennung sind in Artikel 100 der EU-Verordnung 2017/625 (EU, 2017) benannt. Voraussetzungen für die Ernennung zum NRL sind neben der erforderlichen fachlichen Kompetenz unter anderem die Einhaltung von Verschwiegenheitspflicht, Unparteilichkeit und der Ausschluss möglicher Interessenskonflikte. Außerdem muss qualifiziertes Personal, das regelmäßig geschult wird, und eine entsprechende Infrastruktur vorhanden sein. Zu letzterem gehören insbesondere auch geeignete Labore, die die entsprechenden Quarantäne-Sicherheitsanforderungen erfüllen. Darüber hinaus sind Regelungen zu treffen, welche die Aufgabenwahrnehmung auch in Notfällen sicherstellen.

Grundlage für die Ernennung des JKI zum NRL für Deutschland ist der Artikel 7 (2) des Pflanzenschutzgesetzes (PflSchG, (DE, 2012)). Hier ist festgehalten, dass das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) ermächtigt wird, dem JKI die Funktion eines nationalen Referenzlaboratoriums mit den dazugehörigen Aufgaben zuzuweisen. Die Ernennung des JKI zum NRL erfolgte durch das BMEL mit Wirkung ab 11. April 2019 mit der „Verordnung zur Zuweisung der Funktion eines nationalen Referenzlaboratoriums für Schadorganismen der Pflanzen“ vom 10. April 2019 (Pflanzenschadorganismenreferenzlaboratoriumsverordnung, PflSchadORZV, (DE, 2019)). Das JKI ist damit seit April 2019 das offizielle Nationale Referenzlaboratorium für Schadorganismen der Pflanzen in Deutschland.

Die EU-Verordnung 2017/625 regelt nicht nur die Ernennung von EU- und nationalen Referenzlaborato-

rien für Schadorganismen der Pflanzen. Verbunden mit der Funktion eines NRL sind bestimmte Zuständigkeiten und Aufgaben, die insbesondere in Artikel 101 dieser EU-Verordnung geregelt sind.

Die NRLs sind den jeweiligen EU-Referenzlaboratorien (EURL) demnach gegenüber zur Zusammenarbeit verpflichtet. Auf EU-Ebene sind die Referenzlabore nach Delegierter Verordnung (EU) 2018/631 (EU, 2018) für die Bereiche (a) Insekten und Milben, (b) Nematoden, (c) Bakterien, (d) Pilze und Oomyceten, (e) Viren, Viroide und Phytoplasmen, zuständig (siehe Tab. 1 für die Verantwortungsbereiche des NRL JKI). Die NRLs nehmen an internationalen Workshops, Schulungen, und Eignungsprüfungen bzw. Laborvergleichsuntersuchungen teil, die von den EURLs ausgerichtet werden. Die Ergebnisse dieser Eignungsprüfungen werden zur Qualitätssicherung an die EU-Kommission übermittelt.

Die Verordnung legt auch Kriterien für die Zusammenarbeit mit amtlichen Laboratorien in den jeweiligen Mitgliedstaaten fest. Dazu gehört, dass das NRL dafür Sorge trägt, dass die in der Diagnose von Schadorganismen verwendeten Methoden kontinuierlich harmonisiert und verbessert werden. Hierfür werden Schulungen oder Workshops für das Personal der amtlichen Laboratorien durchgeführt und Eignungsprüfungen organisiert und, sofern notwendig, Folgemaßnahmen eingeleitet und die entsprechenden Behörden darüber informiert.

Das NRL dient auch als Schnitt- und Kontaktstelle für den Fluss wichtiger Informationen vom EURL zu den amtlichen Laboratorien. Es verfügt über ein zentrales Postfach, das vom Institut AG des JKI betreut wird. Das NRL stellt, wenn vorhanden, Referenzmaterial für die amtlichen Diagnoselabore direkt zur Verfügung oder kontaktiert bzw. vermittelt alternative Quellen für Referenzmaterial, z. B. die jeweils zuständigen EURLs.

Eine wichtige Aufgabe des NRL ist es, die amtlichen Labore in den jeweiligen Bundesländern bei der Diagnose von Schadorganismen zu unterstützen. Dies betrifft vor allem die Diagnose bei Ausbrüchen und im Falle von nicht vorschriftsmäßigen Sendungen. Auch ist die Bestätigung der Diagnoseergebnisse kritischer Fälle vorgesehen. Das NRL führt in diesen Fällen die entsprechenden Referenzuntersuchungen durch und erstellt für die Einsender der Proben, d. h. die jeweiligen Pflanzenschutzdienste der Bundesländer, Prüfberichte mit den Ergebnissen der Untersuchung der Proben. Die Durchführung von Routine-Diagnosen und Saatgutenerkennungsuntersuchungen/Pflanzgutzertifizierung ist hingegen nicht Teil der Aufgaben des NRL. In diesem Fall verbleibt die Zuständigkeit bei den Pflanzenschutzdiensten der Bundesländer und ihren Laboren.

Für das NRL ist zudem eine Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025 „Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“ verpflichtend. Diese muss entsprechend der aktuellen EU-Gesetzgebung mit einer Übergangsfrist bis spätestens 29. April 2022 nach Begutachtung aller akkreditierungsrelevanten Prüfverfahren und -bereiche durch die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkKS) umgesetzt

Tab. 1. Verantwortungsbereiche der Labore im Rahmen des NRL.

Schadorganismus Gruppe/Art		Matrix	Laborbezeichnung
Bakterien		Pflanzliche Materialien im Allgemeinen <sup>a</sup>	AGQB (Institut AG, Quarantänebakteriologie)
		Obst	OWB (Institut OW, Bakteriologie)
Insekten und Spinnmilben	Thysanoptera (Thripse), Coleoptera (Käfer), Tephritidae (Fruchtfliegen), Fulgoridae (Latenträgerzikaden), Heliothis- und Spodoptera-Arten (Noctuidae, Eulenfalter)	Pflanzliche Materialien im Allgemeinen	AGQE (Institut AG, Quarantäneentomologie)
	Coleoptera (Käfer)	Gehölze	AGQF (Institut AG, forstliche Quarantäneschadorganismen)
	Curculionidae (Rüsselkäfer), Agromyzidae (Minierfliegen), Psylloidea (Blattflöhe), Aleyrodidae (Weiße Fliegen), Tetranychidae (Spinnmilben)	Ethanol, konservierte Individuen	GFE (Institut GF, Entomologie)
	Zikaden	Pflanzliche Materialien	OWE (Institut OW, Entomologie)
	Schildläuse	Pflanzliche Materialien	
	Kleinschmetterlinge (Tortricidae, Wickler)	Obst, Forst, Gartenbau	
	Nematoden		Pflanzliche Materialien im Allgemeinen
Gehölze			AGQF (Institut AG, forstliche Quarantäneschadorganismen)
Oomyceten		Pflanzliche Materialien, Substrate, Wasser	GFO (Institut GF, Mykologie und Oomyceten)
Pilze	Ascomyceten u. Basidiomyceten (außer Rost- und Brandpilze)	Pflanzliche Materialien	AGQMy (Institut AG, Quarantänemykologie)
	Rost- und Brandpilze	Pflanzliche Materialien	EPM (Institut EP, Mykologie)
	Chytridiomyceten ( <i>Synchytrium endobioticum</i> )	Kartoffeln	AKK (Institut A, Mykologie)
Phytoplasmen		Obst, Weinrebe	OWP (Institut OW, Phytoplasmen)
Viren		Pflanzliche Materialien im Allgemeinen	EPV (Institut EP, Virologie)
		Obst, Weinrebe	OWV (Institut OW, Virologie)

<sup>a</sup> jegliches Pflanzenmaterial bis auf die separat angegebene Wirt- oder Matrixspezifität für dieselbe Schadorganismengruppe.

werden. Voraussetzung für die Diagnose von Schadorganismen mit akkreditierten Prüfverfahren ist die vorherige Etablierung eines Qualitätsmanagementsystems in allen Bereichen des JKI, die Prüfungen im Rahmen des NRL durchführen. Dazu gehört auch die regelmäßige erfolgreiche Teilnahme an Eignungsprüfungen und die Durchführung von internen System- und Prozess-Audits. Zur Sicherstellung der geforderten Leistungsfähigkeit durchlaufen sämtliche von den Laboren anzuwendende Prüfverfahren eine Validierung bzw. Verifizierung. Die Definition der Prüfverfahren bzw. ihre Dokumentation erfolgt in entsprechenden Verfahrens- und Arbeitsanweisungen, die immer aktuell gehalten und für alle Mitarbeiter zugänglich sind. Im den insgesamt auf 5 Fachinstitute verteilten 14 Prüflaboren des NRL wird das ganze Spektrum diagnostischer Verfahren angewandt. Hierzu zäh-

len biologische, morphologische, immunologische und molekularbiologische Verfahren.

## 2 Diagnose von Quarantäneschadorganismen im NRL

Die Zahl der durch das NRL abzudeckenden Organismen ergibt sich aus den in der Durchführungsverordnung (EU) 2019/2072 (EU, 2019b) in Anhang II, genannten Unionsquarantäneschädlingen (ca. 175 Organismen oder Organismengruppen), und den neuen, nicht gelisteten Schadorganismen gemäß der Artikel 29 und 30, Absatz 3 (EU) 2016/2031 (EU, 2016).

In Ergänzung dazu ist mit der Verabschiedung der Delegierten Verordnung (EU) 2019/1702 (EU, 2019a) eine Liste von derzeit 20 sogenannten „Prioritären

Schädlingen“ veröffentlicht worden. Diese neu kategorisierten Quarantäneschadorganismen sind dadurch charakterisiert, dass ihre potentiellen wirtschaftlichen, ökologischen oder sozialen Folgen für das Gebiet der Union als besonders schwerwiegend eingeschätzt werden.

Neben den in der EU geregelten Schadorganismen sind auch die in den EPPO-Listen (Alert Liste (Warnliste), A1- (Schadorganismus kommt im EPPO-Gebiet nicht vor) und A2-Liste (Schadorganismus kommt im EPPO-Gebiet vor, ist aber nicht weit verbreitet) aufgeführten Schadorganismen relevant.

### 2.1 Diagnose im Bereich Bakteriologie (AG, OW)

Die Vielzahl der phytopathogenen Bakterien – von Spezialisten mit Relevanz für eine einzige Kultur bis hin zu Generalisten mit hunderten verschiedener Wirtsarten – verbindet das Potential in kürzester Zeit Verbreitung von epidemischen Größenordnungen zu erreichen. Bekämpfungsmöglichkeiten über Kulturmaßnahmen, chemischen oder ökologischen Pflanzenschutz sind nur in Ausnahmefällen verfügbar, meist bieten phytosanitäre Maßnahmen die einzige Eindämmungsmöglichkeit (JANSE, 2005). Umso höhere Bedeutung kommt, insbesondere für die Quarantänebakteriosen, der raschen und zuverlässigen Diagnose der jeweiligen Schaderreger zu. Enge Verwandtschaft mit teils fließenden Übergängen zwi-

schen epiphytischen und phytopathogenen Arten führen zu häufigen taxonomischen Umstrukturierungen, was in der Diagnose von Quarantäneschaderregern die stetige Anpassung der meist PCR- und sequenzbasierten Nachweis- und Differenzierungsmethoden erforderlich macht.

**2.1.1 Diagnose bakterieller Quarantäneschadorganismen im Institut AG (AGQB).** Der Bereich Quarantänebakteriologie im Institut AG (AGQB) ist zuständig für alle Bakteriosen mit Ausnahme der Schadorganismen, die im Obstbau auftreten. Die Diagnose erfolgt schwerpunktmäßig für *Clavibacter sepedonicus* (Abb. 1c), den Erreger der bakteriellen Ringfäule der Kartoffel sowie für *Ralstonia solanacearum*, ein Bakterium, das die Schleimkrankheit bei Kartoffeln hervorrufen und darüber hinaus weitere Wirtspflanzen wie Tomate, Aubergine und Pelargonie befallen kann. Besonders bei der Testung von Pflanzkartoffeln ist es wichtig, dass eine sichere Diagnose dieser beiden Quarantäneschaderreger erfolgt.

Außerdem erfolgt in der Quarantänebakteriologie die Diagnose weiterer, auch wirtschaftlich relevanter Schadorganismen. Dazu gehört der als prioritärer Schadorganismus eingestufte Erreger *Xylella fastidiosa*. Dieser Schadorganismus kann Biofilme im Xylem der Pflanzen bilden und besitzt ein extrem breites Wirtspflanzenspek-



**Abb. 1.** Beispiel einiger im NRL JKI verwendeten Geräte bzw. Methoden und abgedeckten Schadorganismen bzw. Pflanzenkrankheiten. a) Stereomikroskopie (Insektenuntersuchung). b) Droplet digital PCR (ddPCR). c) Symptome von *Clavibacter sepedonicus* an anfälligen Aubergine-Testpflanzen. d) Schlüpfende Juvenile von *Globodera pallida*. e) Symptome von Schwarzfleckkrankheit (CBS) an Orangen und Isolat des Erregers *Phyllosticta citricarpa*. f-h) Nachweis des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum*) mittels Biotests und Nasssiebverfahren.



trum. Dieses umfasst über 300 Wirtspflanzenarten, darunter beispielweise Oleander, Wein, Oliven und Eichen. *X. fastidiosa* hat mehrere Unterarten, darunter die bislang anerkannten Unterarten *ssp. fastidiosa*, *ssp. pauca*, *ssp. multiplex* und *ssp. sandyi*, die sich im Hinblick auf Wirtspflanzenspektrum und Verbreitung unterscheiden. Die Übertragung von *X. fastidiosa* von infizierten auf gesunde Pflanzen erfolgt durch Vektoren, die am Xylem der Pflanzen saugen. Für diesen prioritären Schadorganismus wurde ein Notfallplan für Deutschland erarbeitet und am 11.01.2019 veröffentlicht (BANZ AT 05.04.2019 B8).

Des Weiteren werden Pflanzenproben auf Vorhandensein des Bakteriums *Candidatus Liberibacter solanacearum* untersucht. Dieses Bakterium besiedelt das Phloem von Pflanzen und das Wirtspflanzenspektrum umfasst insbesondere Solanaceen und Apiaceen. Die Übertragung des Bakteriums erfolgt durch Vektoren. *Ca. L. solanacearum* kann in verschiedene Haplotypen unterteilt werden, die sich in Wirtspflanzen- und Vektorenspektrum unterscheiden. Wird *Candidatus Liberibacter solanacearum* in einer Probe nachgewiesen, wird im nächsten Schritt mit der Methode des sog. Haplotyping anhand von Sequenzunterschieden in bestimmten Genregionen untersucht, welcher Haplotyp vorliegt.

Darüber hinaus ist AGQB Ansprechpartner für Fragen zu weiteren bakteriellen Schadorganismen wie *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter americanus* und *Candidatus Liberibacter asiaticus*, die Auslöser der als Huanglongbing oder Citrus-Greening bezeichneten Krankheit an Zitrus, *Ralstonia pseudosolanacearum* an *Solanum* spp., *Ralstonia syzygii ssp. celebesensis* an Bananen und *ssp. indonesiensis* u. a. an Kartoffeln und Tomaten, *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* v. a. an Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), *Pantoea stewartii ssp. stewartii* v. a. an Mais (*Zea mays*), *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* und *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* v. a. an Reis (*Oryza sativa*) sowie für neue Schadorganismen aus dem Bereich Bakteriologie.

Der Nachweis der Schadorganismen in pflanzlichen Materialien erfolgt schwerpunktmäßig mithilfe der molekularbiologischen Verfahren Real-Time PCR und konventioneller PCR.

**2.1.2 Diagnose bakterieller Quarantäneschadorganismen im Institut OW (OWB).** Der Nachweis des bakteriellen Quarantäneschaderegers *Pseudomonas syringae pv. actinidiae* (Kiwikrebs) sowie die beiden Zitrus-pathogenen Pathovaren von *Xanthomonas citri*, *pv. citri* und *pv. aurantifolii*, erfolgt im Institut OW primär über spezifische PCR und quantitative PCR (qPCR)-Methoden in Kombination mit Isolierung und Multi-Locus-Sequenz-Analyse (MLSA). Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Entwicklung einfacher Differenzierungsmethoden zur Abgrenzung der eng verwandten Pathovaren. Neben Nukleinsäure-basierten Techniken wird am Institut auch der schnelle Nachweis über Proteinmuster im MALDI-TOF Biotyping-Verfahren angewendet und für phytopathogene Quarantäneschadereger weiter ausgebaut.

## 2.2 Diagnose im Bereich Entomologie (AG, GF, OW)

Zwei Drittel aller zurzeit bekannten Arten gehören zur Gruppe der Insekten (ANONYM, 2020). Die zuletzt publizierte Artenzahl der beschriebenen Insekten weltweit betrug 962.500 (DATHE, 2003), allerdings sind inzwischen viele neue Arten beschrieben worden. Die Gesamtzahl der Insekten wird heute auf 2,5 bis 30 Millionen Spezies geschätzt, wobei die Annahme von 30 Millionen Arten eher unwahrscheinlich ist (STORK, 2018). Von den Insekten insgesamt sind 1.650 Schadinsekten im Rahmen der Pflanzenquarantäne von Bedeutung (EPPO, 2020). In der EU sind zudem außereuropäische Arten der Familie der Tephritidae geregelt, welche 7.474 Arten beinhalten (KRITZ, 2019).

Nichtendemische Insekten aus anderen Teilen der Welt mit ähnlichen Klimaten wie in der EU und auch Deutschland können eingeschleppt werden und sich etablieren, wenn keine Maßnahmen getroffen werden. Als wechselwarme Organismen können sich Insekten leicht an die sich ändernden europäischen Klimabedingungen anpassen. Insbesondere ermöglichen zunehmende Temperaturen eine weitere Ausbreitung und höhere Vermehrungsraten aufgrund kürzerer Entwicklungszyklen, wodurch das Invasionspotential und damit letztendlich das Schadpotential steigt.

Die Vielzahl der Schadinsekten im pflanzengesundheitlichen Bereich stellt eine große Herausforderung für die Diagnose des NRL dar. Daher ist eine Aufteilung der Bestimmung der Insektengruppen auf drei Institute des JKI erfolgt, welche durch AG (AGQE, AGQF), GF (GFE) und OW (OWE) wahrgenommen werden. Die Schadinsekten können morphologisch und/oder molekularbiologisch bestimmt werden. Die morphologische Bestimmung erfordert i. d. R. ein bestimmtes Entwicklungsstadium, um eine sichere Determination zu ermöglichen. Andererseits können auch trockene und ältere Exemplare bestimmt werden. Die molekularbiologische Bestimmung der Schadinsekten setzt geeignetes DNA-Material voraus, ist aber i. d. R. in der Lage alle Entwicklungsstadien zu bestimmen. In Wahrnehmung der Funktion als NRL befasst sich der entomologische Bereich zusätzlich auch mit anderen Arthropoden, wie Spinnmilben (Tetranychidae). Die gelisteten Quarantäne-Schadinsekten sind von der EU im Rahmen der Gesetzgebung festgelegt worden und grundsätzlich vom NRL diagnostisch abzudecken.

**2.2.1 Diagnose von Quarantäneschadinsekten im Institut AG (AGQE, AGQF).** Bei AGQE liegt der Fokus auf der Diagnose von Quarantäneschadinsekten, aber auch neue, nichtendemische Schadinsekten werden bestimmt. Bei offenen Fragen zur Risikobewertung werden sie durch Forschung ergänzend bearbeitet. Die Zuständigkeit gilt insbesondere für *Thysanoptera* (Thripse), *Coleoptera* (Käfer, außer Forst/AGQF), *Diptera*, nur *Tephritidae* (Fruchtfliegen), und *Fulgoridae* (Spitzkopffzikaden, z. B. *Lycorma delicatula*) sowie Heliothis- und Spodoptera-Arten *Noctuidae* (Eulenfalter). Die langjährige und gut etablierte Diagnose basiert schwerpunktmäßig auf einer morphologischen Bestimmung mittels modernster Licht-

mikroskopie (Abb. 1a). Ergänzt wird diese durch molekularbiologische Methoden, die dank der engen Zusammenarbeit mit dem Arbeitsbereich AGQF in Einzelfällen zum Einsatz kommt. Im Rahmen der Akkreditierung seiner Prüfverfahren konzentriert sich AGQE auf die Bestimmung von *Ceratitis capitata* und *Thrips palmi* als beispielhafte Arten für ein flexibilisiertes Diagnoseverfahren.

Der entomologische Schwerpunkt der Arbeitsgruppe AGQF umfasst Bock- und Prachtkäfer, hier allem voran der invasive Asiatische Laubholzbockkäfer (ALB) – *Anoplophora glabripennis*. Diesen betreffend stehen vor allen Dingen die Weiterentwicklung und Verbesserung der Diagnosemethoden zur Früherkennung des Schaderregers (vgl. ANOPLo-diag-Projekt: <https://pflanzen.fnr.de/index.php?id=11381&fkz=22010316>) im Vordergrund. Des Weiteren wird in diesem Projekt der Aufbau einer Quarantänezüchtstation für ALB und andere Bockkäfer angestrebt. Hierzu kooperiert die Arbeitsgruppe beispielsweise mit internationalen Pflanzenschutzdiensten in Italien, Schweiz und USA. Das breite Spektrum an molekularbiologischen Methoden, von Real-Time PCR, konventioneller PCR, LAMP bis zum Barcoding, ermöglicht einen effizienten Nachweis bzw. die Identifizierung der für Europa und Deutschland relevanten invasiven Käferarten. Der Akkreditierungsbereich – molekularbiologische Diagnoseverfahren für gehölzrelevante Quarantäneschädlingen – beinhaltet durch Flexibilisierung die Abdeckung der Diagnose dieser vielfältigen Schadinsekten.

**2.2.2 Diagnose von Insekten im Institut GF (GFE).** Am Institut GF werden quarantänerelevante Schadinsekten und Milben mit morphologischen Verfahren auf Artenebene bestimmt. Die Auswahl der Arten, die bearbeitet wird, richtet sich nach den Vorgaben für das NRL (s. o.), deckt jedoch nur einen Teil davon ab. Die übrigen Schadinsekten werden an anderen Instituten des JKI bearbeitet. GFE konzentriert sich vorwiegend auf gartenbaulich relevante Arten, da hier die Expertise des Instituts liegt. Basierend auf diesen Auswahlkriterien ist es möglich, bestimmte Taxa vollständig zu bearbeiten, zu denen die Blattflöhe (Psylloidea), die Weißen Fliegen (Aleyrodidae) und die Minierfliegen (Agromyzidae) gehören. Aus anderen Gruppen werden einzelne Arten bearbeitet, z. B. *Eotetranychus lewisi* aus der Familie der Spinnmilben (Tetranychidae) sowie *Conotrachelus nenuphar*, *Naupactus leucoloma* und *Premnotrypes* spp. aus der Familie der Rüsselkäfer (Curculionidae). Für die Bestimmung werden modernste lichtmikroskopische Verfahren verwendet. Dabei wird sowohl der makroskopische sowie der mikroskopische Vergrößerungsbereich abgedeckt. So können morphologische Differentialmerkmale mit bis zu 1000-facher Vergrößerung detailgenau betrachtet und mit hoher Tiefenschärfe fotografisch dokumentiert werden. Für die eindeutige Bestimmung werden Genitalpräparate angefertigt. Die Bestimmungsliteratur wird stetig auf dem neuesten Stand gehalten, wobei auch der rege Austausch mit Fachkollegen auf nationaler und internationaler Ebene von großem Nutzen ist. Derzeit stehen

jedoch noch nicht für alle Organismen festgeschriebene Verfahren zur Verfügung. Im Zuge der Akkreditierung werden zunächst zwei flexibilisierte Diagnoseverfahren für die Minierfliegenarten aus der Gattung *Liriomyza* und für den Blattfloh *Trioza erytreae* erarbeitet, die neben dem Blattfloh *Bactericera cockereli* und der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* zu den prominentesten Arten gehören, die am Institut GF bearbeitet werden.

**2.2.3 Diagnose von Quarantäneschadinsekten im Institut OW (OWE).** Das entomologische Quarantänelabor im Institut OW ist zuständig für Zikaden, Schildläuse und Kleinschmetterlinge (Obst- und Weinbau, Forst, Gartenbau), die als Quarantäneschadorganismen gelistet sind.

Bei den vom NRL zu bearbeitenden Zikaden handelt es sich um Vektoren von Bakterien bzw. Phytoplasmen. Das Bakterium *Xylella fastidiosa* besiedelt das Xylem seiner Wirtspflanzen und wird daher ausschließlich von xylemsaugenden Zikaden übertragen. Während in Europa bisher nur Schaumzikaden (Aphrophoridae) als Vektoren identifiziert wurden, spielen in der Ursprungsregion des Bakteriums, dem amerikanischen Kontinent, besonders die Vertreter der dort sehr artenreichen Unterfamilie der Schmuckzikaden (Cicadellinae) die wichtigste Rolle als Überträger. Sie sind daher als Quarantäneschadorganismen gelistet und ihre Identifizierung ist derzeit ein Schwerpunkt der Arbeit von OWE. Daneben sind die Kleinzikade *Hishimonus phycitis* als Überträger des Limeswites broom Phytoplasmas und die Glasflügelzikade *Haplaxius (Myndus) crudus* als Vektor des Palm lethal yellowing Phytoplasmas zu bearbeiten.

Bei den Schildläusen stellt die Familie der Margarodidae die größte Gruppe von quarantänerelevanten Arten. Arten wie *Margarodes vitis* und *Eurhizococcus brasiliensis* leben an der Wurzel von Reben und können hier Wuchsdepressionen und Absterben der Pflanzen verursachen. Die Schäden ähneln jenen von Rebläusen auf ungepfropften Reben. Arten dieser Gruppe treten vor allem in Südamerika und Südafrika auf. Die Deckelschildläuse aus den Familien der Diaspididae *Lopholeucaspis japonica* und *Unaspis citri* sind polyphage Arten und treten in Teilen Europas bereits auf. *Ripersiella hibisci* ist eine polyphage an Wurzeln lebende Schmierlaus (Fam. Pseudococcidae), die vor allem an Gewächshauspflanzen zu erwarten ist. Sie wurde in Europa bereits nachgewiesen.

Bei den über 20 quarantänerelevanten Kleinschmetterlingen aus der Familie der Wickler (Lepidoptera: Tortricidae) handelt es sich überwiegend um Obstschädlinge und Forstschädlinge aus Fernost und Nordamerika. Eine Art aus der Familie der Gelechiidae (*Keiferia lycopersiella*) befällt Tomaten in Südamerika.

### 2.3 Diagnose im Bereich Pilze und Oomyceten (A, AG, EP, GF)

Pilze und Oomyceten sind sehr artenreiche Organismengruppen und verursachen weltweit ungefähr zwei Drittel aller Pflanzenkrankheiten und hohe Ertragseinbußen an Nutzpflanzen (BODDY, 2016). Dies spiegelt sich auch in der Anzahl geregelter Arten (Durchführungsverordnung

(EU) 2019/2072 (EU, 2019b) in Anhang II (EU, 2019b)) wider, wobei Pilze und Oomyceten die zweitumfangreichste Schadorganismengruppe bilden. Regelmäßig werden neue Arten entdeckt und beschrieben. Diese gehören häufig zu sogenannten Artkomplexen, die phylogenetisch eng miteinander verwandt und anhand morphologischer Merkmale oft nur schwer oder gar nicht unterscheidbar sind. Infolgedessen ist eine verlässliche Diagnose meist auch auf molekularbiologische Methoden angewiesen. In den verschiedenen Laboren des NRL, um die Schadpilze und Oomyceten zu diagnostizieren, kommen je nach Schaderreger verschiedenste Methoden zur Anwendung. Diese beinhalten die Kultivierung von Pilzen und Oomyceten, morphologische Analysen, Nasssiebverfahren und Biotests, konventionelle und quantitative PCR sowie die Identifizierung anhand von DNA-Sequenzvergleichen und molekularphylogenetischen Analysen („DNA-Barcoding“).

**2.3.1 Diagnose von Kartoffelkrebs (Chytridiomyceten) im Institut A (AKK).** Der Kartoffelkrebs *Synchytrium endobioticum* ist einer der bedeutendsten Quarantäneschaderreger für den Kartoffelanbau. Dieser bodenbürtige Pilz kann durch die Ausbildung von Dauersporen mehr als 40 Jahre im Boden überdauern (PRZETAKIEWICZ, 2015). Die vorgeschriebene Sperrung von Befallsflächen stellt so ein langfristiges Problem für den Kartoffelanbau dar. Bis heute sind über 40 Pathotypen beschrieben, die eine unterschiedliche Pathogenität an verschiedenen Kartoffelsorten aufweisen. Da der Anbau resistenter Kartoffelsorten die einzige Möglichkeit für die Eindämmung von Kartoffelkrebs darstellt, ist die Identifikation der Pathotypen von herausragender Bedeutung.

Zu den diagnostischen Methoden im Prüfbereich AKK zählt der Nachweis von *S. endobioticum* in Boden- und Gewebeproben mittels Nasssiebverfahren (Abb. 1f–h) und Mikroskopie. Für die Identifikation der Pathotypen wird ein Biotest nach der Glynne-Lemmerzähl-Methode eingesetzt. Hierbei wird ein Differentialsortiment von Kartoffelsorten, deren Resistenz gegenüber bestimmten Pathotypen bekannt ist, mit dem zu testenden Material infiziert und anschließend die Anfälligkeit der verschiedenen Sorten beurteilt. Des Weiteren wirkt AKK an der Harmonisierung von Testmethoden auf EU-Ebene mit und war sowohl an der Erarbeitung des EPPO-Standards zur Diagnose von *S. endobioticum* (PM 7/28, EPPO, 2020) als auch des EPPO-Standards zur Resistenzprüfung beteiligt. Auf nationaler Ebene unterstützt AK die Pflanzenschutzdienste (PSD) der Bundesländer bei der Etablierung und Harmonisierung der Testverfahren. Dazu wurden die Mitarbeiter der PSD in Workshops zur Diagnose von *S. endobioticum* geschult und bei methodischen und diagnostischen Fragen beraten.

**2.3.2 Diagnose von Asco- und Basidiomyceten im Institut AG (AGQMy).** Die Zuständigkeit des Arbeitsbereiches AGQMy erstreckt sich auf Ascomycota und Basidiomycota, mit Ausnahme von Rost- und Brandpilzen, die im Prüflabor EPM bearbeitet werden. In Rahmen der Refe-

renzfunktion führt das Labor AGQMy die Diagnose von neu auftretenden oder bereits Quarantäneregelungen unterliegenden Pilzarten durch. Die bereits etablierten bzw. nicht mehr geregelten pilzlichen Schadorganismen werden an anderen Instituten gearbeitet. Bei dieser Diagnoseaktivität liegt der Schwerpunkt insbesondere auf der Beteiligung an der Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung von Quarantärepilzen, in Zusammenarbeit mit den Pflanzenschutzdiensten der Länder. Durch die Kontrollstellen in den Bundesländern werden Proben von Importsendungen aus Drittländern, die verdächtige Symptome aufweisen, genommen. Die zu verwendenden diagnostischen Verfahren basieren auf validierten, vorzugsweise molekularen Methoden (cPCR, Real-Time-PCR und DNA-Barcoding) aus EPPO Standards der PM 7 Serie (EPPO, 2020). Entsprechend der für jeweilige Erreger gegenwärtigen Relevanz liegt der Fokus von AGQMy zur Zeit auf *Phyllosticta citricarpa* (Zitrus-Schwarzfleckenkrankheit) (Abb. 1e), *Fusarium circinatum* (Pechkrebs der Kiefer), *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini*, *Lecanosticta acicola* (Dothistroma-Nadelbräune), und *Cryphonectria parasitica*. Im Rahmen der Akkreditierung seiner Prüfverfahren beteiligt sich AGQMy mit einem flexibilisierten Akkreditierungsbereich und kann somit die Diagnose auch der anderen quarantänerelevanten Pilzarten abdecken. Für diese Schadorganismen sind in der AGQMy-Arbeitssammlung aktuell auch Isolate als Positivkontrollen hinterlegt.

**2.3.3 Diagnose von Rost- und Brandpilzen im Institut EP (EPM).** Mit über 7000 bzw. rund 1500 beschriebenen Arten weltweit stellen die Rost- und Brandpilze zwei der artenreichsten pflanzenparasitischen Gruppen der Pilze. Gegenwärtig sind hiervon 22 Arten als potentielle Quarantäneschadorganismen auf der EPPO A1- und A2-Liste zur Regelung vorgeschlagen. Das Labor EPM strebt eine Flexibilisierung des Akkreditierungsbereiches an, so dass ein umfangreiches Repertoire dieser Rost- und Brandpilze diagnostiziert werden kann. Die Identifizierung erfolgt dabei durch die molekularphylogenetische Analyse geeigneter DNA-Regionen, dem sogenannten „DNA-Barcoding“. Exemplarisch wurde die Methode vom Prüflabor EPM für *Thekopsora minima* (EPPO A2-Liste) validiert.

Der Erreger des Rosts der Nordamerikanischen Strauchheidelbeere (*Vaccinium corymbosum*, Ericaceae) wurde zum ersten Mal 2015 für Deutschland und Europa gesichert nachgewiesen (SCHRADER & MAIER, 2015). Die Methode wurde anhand DNA-Sequenzierung der LSU und der ITS-Region der ribosomalen Gene validiert. Es wurde ein detailliertes Protokoll sowie ein Datensatz zur schnellen und einfachen Unterscheidung des invasiven amerikanischen Rostpilzes von nah verwandten Arten entwickelt. Mit dieser Methode kann *Thekopsora minima* auch eindeutig von *Naohidomyces vaccinii*, dem Erreger des Rosts der Europäischen Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) unterschieden werden.

Dieser und weitere kuratierte Datensätze werden nach der Validierung den Pflanzenschutzdiensten künftig zur



Verfügung gestellt, um ihnen nach der DNA-Sequenzierung die eindeutige Einordnung der Schadorganismen selbst zu ermöglichen.

**2.3.4 Diagnose von Oomyceten-Arten im Institut GF (GFO).** Eine der wirtschaftlich bedeutendsten phytopathogenen Mikroorganismengruppe ist die Gattung *Phytophthora*. *Phytophthora*-Arten sind pilzähnliche Mikroorganismen und gehören systematisch zu den Oomycota aus dem Reich der Chromista. Zu der Gattung zählen über 150 Arten, die weltweit massive Pflanzenschäden verursachen können. Gefürchtet sind nicht nur Arten, die Kulturen in den Gartenbaubetrieben befallen, sondern besonders die *Phytophthora*-Arten, die Pflanzen im Kontext von Baumschulen, urbanem Grün und in Waldgebieten schädigen, wo eine chemische Bekämpfung nicht möglich ist. Zu diesen *Phytophthora*-Arten zählen unter anderem die Quarantäneschadorganismen *P. ramorum*, *P. lateralis* und *P. kernoviae*.

Der Prüfbereich GFO führt seit vielen Jahren die Diagnose von *P. ramorum* und *P. kernoviae* durch und war an der Erarbeitung des EPPO Diagnoseprotokolls PM 7/66 (1) für *Phytophthora ramorum* beteiligt. In nationalen und internationalen Forschungsprojekten (EU, USA) wurden epidemiologische Grundlagen zu diesem bedeutenden Schadorganismus mit erarbeitet, die maßgeblich zur Erstellung der Risikoanalyse beigetragen haben.

Die Diagnose von *Phytophthora*-Arten aus pflanzlichen Materialien, Substraten und Wasser erfolgt mit unterschiedlichen Methoden aus den Bereichen Molekularbiologie, Mikrobiologie und Morphologie. Molekularbiologisch findet die Diagnose hauptsächlich mittels konventioneller PCR oder Real-Time PCR statt. Zusätzlich werden die Pathogene isoliert und sowohl morphologisch anhand der typischer Weise auftretenden Strukturen (Lichtmikroskopie) als auch durch Sequenzanalyse bestimmt.

Eine besondere Herausforderung stellt die Isolierung von *Phytophthora*-Arten aus Substraten und Wasser dar. Dazu wurde in der Arbeitsgruppe erstmalig in Europa ein Köderverfahren mit Rhododendronblättern validiert (JUNKER et al., 2018). Da nur intakte Strukturen von *P. ramorum* das unverletzte Blattgewebe infizieren können, gibt das Verfahren auch Auskunft über die Vitalität des Erregers in der untersuchten Probe.

Weiterhin werden von GFO regelmäßig Eignungsprüfungen angeboten, bei denen die amtlichen Diagnoselabore der Bundesländer u. a. ihre Kompetenz überprüfen und belegen können. Insbesondere gilt es dabei *P. ramorum* und *P. kernoviae* aus kontaminiertem Substrat zu isolieren und anschließend mittels morphologischer und molekularbiologischer Analyse eindeutig nachzuweisen.

Der Prüfbereich GFO unterhält eine Stammsammlung mit ca. 1350 Isolaten, die ca. 67 *Phytophthora*-Arten zugerechnet werden können. Diese dienen zum einen als internes Referenzmaterial für alle Untersuchungen im Rahmen des NRL. Zum anderen können sie auf Anfrage als nicht-zertifiziertes Referenzmaterial den Diagnose-

laboren der Pflanzenschutzdienststellen zur Verfügung gestellt werden.

## 2.4 Diagnose im Bereich Nematologie (AG)

Phytonematoden verursachen weltweit z. T. erhebliche Ertragsausfälle an landwirtschaftlichen, gartenbaulichen und auch forstlichen Kulturpflanzen. Nematoden entziehen den Pflanzen Nährstoffe, verursachen Verwundungen, übertragen Krankheitserreger, schwächen die pflanzliche Abwehr oder führen zu unspezifischen Abwehrreaktionen der betroffenen Pflanzen. Dies führt in nicht wenigen Fällen zum Absterben der Pflanzen. Die Anzahl von geregelten Nematoden umfasst etwa 20 Arten. Darunter befinden sich bei den Quarantänenematoden Arten mit erheblichem Schadpotenzial insbesondere für den Kartoffelanbau, aber auch Gehölze (speziell Arten der Gattung *Pinus*) stehen vor dem Hintergrund des Klimawandels großen Gefahren und Herausforderungen gegenüber.

**2.4.1 Diagnose forstlicher Quarantänenematoden im Institut AG (AGQF).** Das zoologisch orientierte forstliche Quarantänelabor befasst sich mit Gehölz- und forstlich relevanten Quarantäneschadorganismen; fachlich ist dieser Bereich sehr breitgefächert und als eine Schnittstelle zu den anderen Quarantänelaboren Entomologie, Mykologie und Nematologie aufgestellt. Von der bereits erwähnten, 20 Arten umfassenden Liste der Prioritären Schädlinge sind allein 9 von unmittelbarer Gehölz- bzw. forstpathologischer Relevanz. HOPPE et al. (2020a) liefern hierzu eine Kurzcharakterisierung zu den entsprechenden Organismen. Einen besonderen fachlichen Schwerpunkt umfasst der seit 1999 in der EU (Portugal und Spanien) nachgewiesene Kiefernholznematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Neben Monitoring, Diagnose und Erarbeitung von Notfallmaßnahmenplänen wird aktiv an der Lebenderhaltungszucht von 48 *Bursaphelenchus*-Arten gearbeitet. Diese umfangreiche Sammlung ist eine der größten ihrer Art weltweit und beteiligt sich an der Bereitstellung von Referenzmaterial (vgl. HOPPE et al., 2020b in diesem Themenheft). Die entomologischen Schwerpunkte von AGQF werden unter 2.2.1 erläutert.

**2.4.2 Diagnose von Quarantänenematoden im Institut AG (AGQN).** Der Prüfbereich AGQN bearbeitet in seiner Zuständigkeit alle geregelten phytopathogenen Nematoden, ausgenommen Arten im Bereich Forst (*Bursaphelenchus xylophilus*). Der Fokus liegt auf Kartoffelzysten-nematoden (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*) und nicht in Deutschland heimischen *Meloidogyne*-Arten (*M. chitwoodi* und *M. fallax*). Ebenfalls von großer Bedeutung sind die als Unionsquarantäne-Nematoden geregelten Arten der Gattungen *Hirschmanniella* spp. (5 Arten), *Longidorus diadecturus*, *Nacobbus abberans* und nicht europäische *Xiphinema* Arten/Population, die in Deutschland bislang sehr eingeschränkt auftreten. Die Diagnosemethoden umfassen auch morphologische Untersuchungen, die aber in jedem Fall molekularbiologisch zu verifizieren sind. Den größten Umfang an Unter-



suchungen und Regelungen nehmen dabei die Kartoffelzystennematoden ein. Kartoffelzystennematoden werden dabei mittels eines dichtebasierten Verfahrens nach OOSTENBRINK (1960) aus Bodenproben extrahiert und anschließend morphologisch auf Gattungsebene anhand der Zystenform identifiziert. Die Artidentifikation von Nematoden ohne „vulval cone“ als typischem Merkmal der Gattung *Globodera* erfolgt mittels konventioneller PCR und gelelektrophoretischer Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte. Barcoding-Sequenzierung wird zukünftig ebenfalls genutzt, um den Nachweis bzw. die Identifizierung aller übrigen Nematoden-Arten zu sichern. Das zu akkreditierende Prüfverfahren im flexiblen Akkreditierungsrahmen beinhaltet gegenwärtig *Globodera rostochiensis* und *Globodera pallida* (Abb. 1d). Weiterhin wird im Prüfbereich AGQN eine etwa 200 Populationen umfassende Arbeitssammlung zur Gattung *Globodera*, welche neben den Kartoffelzystennematoden *Globodera pallida* und *G. rostochiensis* auch nahe verwandte Arten wie *Globodera tabacum*, *G. artemisiae* und *G. millefolii* beinhaltet, erhalten und kontinuierlich vermehrt. Eine kleinere Arbeitssammlung zu den regulierten Nicht-Quarantäne-Schädlingen der Gattung *Ditylenchus* umfasst sieben Populationen von *D. dipsaci* (3) und *D. destructor* (4).

### 2.5 Diagnose im Bereich Phytoplasmologie (OW)

Phytoplasmen sind zellwandlose, pleomorphe Bakterien aus der Klasse der Mollicutes, die als obligate Zellparasiten das Phloem von Pflanzen besiedeln. Daneben infizieren sie die Gewebe phloemsaugender Zikaden und einiger Psylliden, die ihnen als Vektoren dienen. Dabei weisen viele Phytoplasmen eine hohe Vektorspezifität auf. Infolge ihrer Anpassung an die obligat biotrophe Lebensweise zeichnen sich Phytoplasmen durch kleine Genomgrößen und reduzierte Stoffwechselwege aus. Dennoch sind sie in der Lage, sich an die sehr unterschiedlichen Bedingungen zu adaptieren, die sich durch den zwingenden Wechsel zwischen pflanzlichen und tierischen Wirten ergeben. Phytoplasmen verursachen Krankheiten bei mehreren hundert Pflanzenarten, darunter wichtige mono- und dikotyle annuelle und perennierende Kulturpflanzen. In Europa sind Phytoplasmosen der Rebe sowie von Stein- und Kernobst von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung. Daher sind die an diesen Wirten sowie an Beerenobst, Citrus und Kokospalmen vorkommenden außereuropäischen Phytoplasmen wie auch das in Europa auftretende Flavescence dorée Phytoplasma als Quarantäneschadernerger eingestuft.

**2.5.1 Diagnose von Phytoplasmen als Quarantäneschadernerger im Institut OW (OWP).** Phytoplasmen sind besonders im Obst- und Weinbau als Schaderreger von großer Bedeutung. Daher ist der Arbeitsbereich ‚Phytoplasmen‘ im Institut OW für alle als Quarantäneschadernerger eingestufte Phytoplasmen zuständig. Die Phytoplasmen werden durch spezifische PCR- und qPCR-Verfahren nachgewiesen. Das Spektrum der Erreger umfasst das im europäischen Weinbau sehr schädliche

Grapevine Flavescence dorée Phytoplasma sowie außereuropäische Phytoplasmen an Obst, Weinreben und Palmen. Die Diagnose der Flavescence dorée stellt derzeit einen Schwerpunkt dar. Die Krankheit kann anhand der Symptome nicht von anderen Phytoplasmosen der Rebe unterschieden werden, breitet sich jedoch im Gegensatz zu diesen epidemisch aus, da sie durch die eingeschleppte amerikanische Rebzikade *Scaphoideus titanus* sehr effektiv von Rebe zu Rebe übertragen wird. Für eine eindeutige Differenzierung zwischen dem Grapevine Flavescence dorée Phytoplasma und ähnlichen, von *S. titanus* nicht übertragbaren Phytoplasmen in Wildpflanzen und Reben sind DNA-Sequenzanalysen erforderlich.

Als RNQP werden die mit Obstphytoplasmosen assoziierten Schaderreger *Candidatus* Phytoplasma mali (Apfeltriebsucht), *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Europäische Steinobstvergilbung) und *Candidatus* Phytoplasma pyri (Birnenverfall) sowie der Erreger der Schwarzwilzkrankheit (Bois noir) der Rebe, *Candidatus* Phytoplasma solani, bearbeitet.

### 2.6 Diagnose im Bereich Virologie (EP, OW)

Pflanzenviren stellen die größte Gruppe von neuauftretenden Schaderregern dar (ANDERSON et al., 2004). Nicht zuletzt bedingt durch veränderte klimatische Bedingungen dringen arthropodische Virusvektoren in neue geographische Gebiete vor, in denen die Viren großen Schaden an Kulturpflanzen hervorrufen können (CANTO et al., 2009; JONES, 2016). Derzeit sind auf den EPPA A1- und A2-Listen knapp 50 verschiedene Viren und Viroide erfasst; die EU-Durchführungsverordnung 2019/2072 (EU, 2019b) definiert 22 Virus-/Viroidgruppen als Quarantäneschädlinge und listet zahlreiche weitere Viren und Viroide als regulierte Nicht-Quarantäne-Schädlinge. Die gelisteten Viren und Viroide befallen vor allem Obstgehölze und Weinreben, Kartoffeln und Solanaceen sowie Gemüsekulturen, können jedoch auch andere Kultur- und Nichtkulturarten befallen. Aufgrund des hohen Schadpotentials ist eine schnelle Diagnostik notwendig, die zugleich den Ansprüchen der Sensitivität und Spezifität genügt. Es ist so z. B. notwendig, das neuauftretende tomato brown fruit rugose virus von anderen Tobamoviren, die nicht geregelt sind, zu unterscheiden. Am JKI werden Pflanzenviren nach Wirtsgruppen getrennt bearbeitet, auch wenn im Einzelfall die Wirtskreise überlappen können. So werden am Institut EP Viren und Viroide an Gemüsekulturen und Leguminosen bearbeitet, am Institut OW stellen Obst- und Rebenviren den Forschungsschwerpunkt dar. Zur Diagnose kommen verschiedene Methoden aus dem Bereich der Serologie, der Molekularbiologie und der Elektronenmikroskopie zum Einsatz.

**2.6.1 Diagnosen von Viren und Viroiden im Institut EP (EVP).** Zahlreiche Pflanzenviren und -viroide gefährden den erfolgreichen Anbau von Kulturpflanzen. Die Mehrzahl dieser Schadorganismen hat einen sehr weiten Wirtskreis, so dass zahlreiche Kombinationen von Matrix und Prüfling möglich sind. Dazu kommen verschiedene Nach-

weismethoden, insbesondere serologische und molekularbiologische Tests, die einen generischen oder sehr spezifischen Virus-/Viroidnachweis ermöglichen. Es ist daher angestrebt, sich „flexibel“ für mehrere Nachweisverfahren zu akkreditieren und diese dann auf spezifische Schadorganismen anzuwenden. Im Fokus der Akkreditierung stehen daher verschiedene serologische Nachweise (insbesondere DAS-ELISA) und molekularbiologische Nachweise (RT-PCR, qRT-PCR) für Schaderreger an Tomaten: tomato brown rugose fruit virus (Tobamovirus mit erheblichem Schadpotenzial (WILSTERMANN & ZIEBEL, 2019)), pepino mosaic virus, Pospiviroiden sowie physostegia chlorotic mottle virus. Weitere Vorgaben werden z. B. durch das EURL erstellt, so dass zukünftig auch Nachweisverfahren für tomato leaf curl New Delhi virus und rose rosette virus etabliert werden müssen und sich somit die Liste der Prüfverfahren sowie Prüflinge kontinuierlich erweitert.

Das Prüflabor EPV verfügt über eine große Sammlung von Virusisolaten von geregelten und nicht-geregelten Pflanzenviren und -viroiden, die auf lebenden Pflanzen erhalten werden oder auf verschiedene Weise konserviert wurden (z. B. Gefriertrocknung, Einfrieren) und als Kontrollen für Nachweisverfahren dienen. Aus den Vorgängerinstitutionen des JKI (Biologische Bundesanstalt, Bundesanstalt für Züchtungsforschung) wurde eine umfassende Antiserumsammlung übernommen; derzeit sind rund 2000 polyklonale Antiseren gelistet, die für den Virusnachweis eingesetzt werden können; hinzu kommen zahlreiche monoklonale Antikörper. Bereits in der Vergangenheit gab es eine enge Zusammenarbeit mit Pflanzenschutzdiensten im Bereich Diagnostik und Fortbildung.

**2.6.2 Diagnose von Viren als Quarantäneschadorganismen im Institut OW (OWV).** In den Aufgabenbereich des Quarantänelabors Virologie im Institut OW fallen nicht-europäische Viren, die hauptsächlich Zitruspflanzen, Beeren- und Steinobst befallen. Das peach rosette mosaic virus (PRMV; Gattung *Nepovirus*) richtet überwiegend Schaden an Pfirsich an, wurde aber auch bereits an Weinreben diagnostiziert. Das peach mosaic virus (PcMV; Gattung *Trichovirus*) sowie das cherry rasp leaf virus (CRLF, Rauhblättrigkeit der Kirsche; Gattung *Cheravirus*) sind weitere Quarantäneschaderreger des Pfirsichs.

Daneben weisen Beerenobst schädigende Viren wie das blueberry leaf mottle virus (BLMoV; Gattung *Nepovirus*), das raspberry leaf curl virus (RLCV; unclassified) und das black raspberry latent virus (BRLV; Gattung *Ilarvirus*) Quarantänestatus auf.

Als Quarantäneviren der Zitruspflanzen sind das Satsuma dwarf virus (SDV; Gattung *Sadwavirus*; mit Satsumamandarinbaum, Sojabohne und anderen Zitrusgewächsen als Wirtspflanzen) und der citrus leprosis Viruskomplex gelistet. Die citrus leprosis Krankheit führt zu enormen Schäden an Zitruspflanzen und ist mit mindestens fünf verschiedenen Viren assoziiert: citrus leprosis virus C (CiLV-C), citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2), hibiscus green spot virus 2 (HGSV-2), citrus

leprosis virus N sensu novo (CiLV-N; Gattung *Dichorhavirus*) und dem Zitrusstamm des orchid fleck dichorhavirus (alle den *Rhabdoviridae* bzw. *Kitaviridae* zugehörig). Citrus leprosis breitet sich derzeit auf dem amerikanischen Kontinent aus, wurde aber kürzlich ebenfalls in Südafrika detektiert. Eine weitaus größere Verbreitung weisen jedoch die Vektoren dieser Viren auf. Milben der Gattung *Brevipalpus* sind in Europa vorhanden. Dies hat großen Einfluss auf die phytosanitären Risiken der citrus leprosis Viren. Ein Focus von OWV liegt auf dem Nachweis des American plum line pattern virus (APLPV; Gattung *Ilarvirus*), das bisher vor allem in Amerika, Asien und Ozeanien auftrat, aber bereits in Italien nachgewiesen wurde. Die Detektion von APLPV mittels Reverser Transkription-PCR soll als Grundlage für ein flexibel akkreditiertes Prüfverfahren dienen.

Im Bereich der Quarantäneviren kommt neben den vorrangig eingesetzten molekularen Detektionsmethoden das immunologische Verfahren ELISA zum Einsatz.

Neben phytopathogenen Viren mit Quarantänestatus werden am Institut OW im Bereich Virologie Regulierte Nicht-Quarantäne-Schaderreger (RNQP) wie das Sharkavirus (plum pox virus; PPV), die Blattrollkrankheit auslösenden Rebviren grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) und grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) sowie little cherry virus 1 und 2 (LChV-1 bzw. LChV-2; Kleinfrüchtigkeit der Kirsche) bearbeitet.

### 3 Weitere Aufgaben und Pflichten des NRL

Die Struktur des NRL zeigt die Zuordnung der Verantwortungsbereiche nach Schadorganismengruppe oder -art. Das Institut AG beteiligt sich an allen Arbeitsbereichen mit Ausnahme der Virologie und ist zuständig für die Diagnose von Quarantäneschadorganismen. Weitere am NRL beteiligte Institute (A, EP, GF, OW) und deren Zuständigkeitsbereiche beschäftigen sich darüber hinaus mit unregulierten bzw. nicht-Quarantäne Schadorganismen. Es besteht eine intensive Zusammenarbeit des NRL mit internationalen Experten im Rahmen von EPPO Panels, EWGs (Experts Working Groups). EPPO Panels erarbeiten und begutachten spezifische Protokolle für Schadorganismen. Zudem werden die Inhalte von veröffentlichten Diagnoseprotokollen der IPPC (International Plant Protection Convention) mit den Protokollen der EPPO abgeglichen. Wissenschaftler\*innen des NRL sind aktiv an der Verbesserung von Diagnoseverfahren sowie an der Etablierung neuer Methoden, der Harmonisierung von Methoden und dem Erfahrungsaustausch beteiligt. Informationen zu Diagnosen und Eignungsprüfungen, die im Rahmen des nationalen Referenzlabors angeboten werden, sind künftig über die Internetseite des NRL (aktuell in der Testphase) verfügbar. Auf dieser Homepage wird auch ein Überblick über die jeweiligen Ansprechpartner für bestimmte Schadorganismen im JKI erscheinen, ebenso wie Kontakte und Informationen für die Pflanzenschutzdienste sowie Online-Formulare für die Anmeldung von Proben für Referenzuntersuchungen.

Beiden Seiten, d. h. den Prüflaboren des NRL und den Diagnoselaboren der Pflanzenschutzdienste der Bundesländer, wird dort außerdem eine Plattform für das Anbieten und die Anmeldung von Schulungen und Workshops geboten.


### Erklärung zu Interessenskonflikten

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.


### Literatur

- ANDERSON, P.K., A.A. CUNNINGHAM, N.G. PATEL, F.J. MORALES, P.R. EPSTEIN, P. DASZAK, 2004: Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 535–544, DOI: 10.1016/j.tree.2004.07.021.
- ANONYM, 2020: URL: <https://www.dgae.de/de/was-ist-entomologie.html>, Access: 24.06.2020.
- BODDY, L., 2016: Pathogens of autotrophs. In: *The Fungi*. WATKINSON, S.C., N. MONEY, L. BODDY (Eds.), Academic Press, p. 245–292, DOI: 10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6.
- CANTO, T., M.A. ARANDA, A. FERERES, 2009: Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology* **15**, 1884–1894, DOI: 10.1111/j.1365-2486.2008.01820.x.
- DATHE, H.H., 2003: Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere. 5. Teil: Insecta. - Heidelberg, Berlin (Spektrum Akademischer Verlag GmbH). - 961 p.
- DE, 2012: Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz – PflSchG) vom 6. Februar 2012. (BGBl. I S. 1666), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 84 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist.
- DE, 2019: Verordnung zur Zuweisung der Funktion eines nationalen Referenzlaboratoriums für Schadorganismen der Pflanzen (Pflanzenschadorganismenreferenzlaborzuweisungsverordnung – PflSchadORZV) vom 10.04.2019, BGBl, Jahrgang 2019 Teil I Nr. 13.
- EPP0, 2020: URL: [https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo\\_databases/global\\_database](https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_databases/global_database), Access: 24.06.2020.
- EU, 2016: Verordnung (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 26. Oktober 2016 über Maßnahmen zum Schutz von Pflanzenschädlingen, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 228/2013 (EU) Nr. 652/2014 und (EU) 1143/2014 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinien 69/464/EWG, 74/647/EWG, 98/57/EG, 2000/29/EG, 2006/91/EG und 2007/33/EG des Rates. ABl. L 317 vom 23.11.2016.
- EU, 2017: Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 999/2001, (EG) Nr. 396/2005, (EG) Nr. 1069/2009, (EG) Nr. 1107/2009, (EU) Nr. 1151/2012, (EU) Nr. 652/2014, (EU) 2016/429 und (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 1/2005 und (EG) Nr. 1099/2009 des Rates sowie der Richtlinien 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG und 2008/120/EG des Rates und zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG und 97/78/EG des Rates und des Beschlusses 92/438/EWG des Rates (Verordnung über amtliche Kontrollen). ABl. L 095 vom 7.4.2017.
- EU, 2018: Delegierte Verordnung (EU) 2018/631 der Kommission vom 7. Februar 2018 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates durch die Einrichtung von Referenzlaboratorien der Europäischen Union für Pflanzenschädlinge ABl. L 105 vom 25.04.2018.
- EU, 2019a: Delegierte Verordnung (EU) 2019/1702 der Kommission vom 1. August 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates durch die Aufstellung einer Liste der prioritären Schädlinge, ABl. L 260 vom 11.10.2019.
- EU, 2019b: Durchführungsverordnung (EU) 2019/2072 der Kommission vom 28. November 2019 zur Festlegung einheitlicher Bedingungen für die Durchführung der Verordnung (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates in Bezug auf Maßnahmen zum Schutz vor Pflanzenschädlingen und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 690/2008 der Kommission sowie zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2018/2019 der Kommission. ABl. L 319 vom 10.12.2019.
- HOPPE, B., A. WILSTERMANN, M. BECKER, E. FORNEFELD, E. SCHRADER, T. SCHRÖDER, 2020a: Quarantäneschadorganismen in Gehölzen – was hat sich verändert, was kommt auf uns zu? *Jahrbuch der Baumpflege* In: DUJESIEFKEN, D. (Ed.): *Jahrbuch der Baumpflege* 2020, 34–45.
- HOPPE, B., H. BRAASCH, S. URBAN, T. SCHRÖDER, 2020b: Die in vitro-Zuchten von *Bursaphelenchus* spp. am Referenzlaboratorium für Schadorganismen am JKI in Braunschweig. *Journal für Kulturpflanzen* **72** (8), 415–420, DOI: 10.5073/jfK.2020.08.12.
- JANSE, J.D., 2005: *Phytopathology: Principles and practise*, CABI, 360 p.
- JONES, R.A.C., 2016: Future scenarios for plant virus pathogens as climate change progresses. *Advances in Virus Research* **95**, 87–147, DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.02.004.
- JUNKER, C., A. PFAFF, S. WERRES, 2018: Validation of the bait test with rhododendron leaves for *Phytophthora ramorum*. *Bulletin OEPP EPP0 Bulletin*, **48** (3), 595–609, DOI: 10.1111/epp.12509.
- OOSTENBRINK, M., 1960: Estimating nematode populations by some selected methods. In: *Nematology*. SASSER J.N., W.R. JENKINS (Eds.), The University of North Carolina Press, Chapel Hill, NC (US), p. 85–102.
- SCHRADER, G., W. MAIER, 2015: Express – PRA zu *Thekopsora minima*. *Journal für Kulturpflanzen* **67** (10), 348–352.
- KRITZ, N., 2019: Request for data/comments on the draft list of non-EU Tephritidae. Ref. NK/GS/VK/EC/ssl (2019) -out-21724014.
- PRZETAKIEWICZ, J., 2015: The Viability of Winter Sporangia of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. from Poland. *American Journal of Potato Research* **92**, 704–708, DOI: 10.1007/s12230-015-9480-6.
- STORK, N.E., 2018: How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? *Annual Review of Entomology*, Vol. **63**, 31–45, DOI: 10.1146/annurev-ento-020117-043348.
- WILSTERMANN, A., H. ZIEBELL, 2019: Tomato brown rugose fruit virus: JKI Datenblätter Pflanzenkrankheiten und Diagnose **1**, 1–7, DOI: 10.5073/20190404-160233.

© Der Autor/Die Autorin 2020.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2020.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).