

## Molekulare Phytomedizin / Diagnose- und Nachweisverfahren

076 - Grund, E.; Darissa, O.; Adam, G.  
Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek

### **Bewertung von FTA Karten zur Sammlung von Nukleinsäureproben von mikrobiellen Pflanzenpathogenen und deren PCR-Nachweis**

Evaluation of FTA cards for collecting nucleic acid probes of microbial plant pathogens and their PCR detection

Der PCR- oder RT-PCR-Nachweis mikrobieller Pflanzenpathogene gewinnt zunehmend an Bedeutung, einmal wegen der höheren Nachweisempfindlichkeit und zum anderen wegen der zunehmenden Zahl verfügbarer Sequenzdaten. Dafür ist es allerdings auch notwendig, die Beprobung und Extraktion der erforderlichen Nukleinsäure einfach, sicher und zuverlässig zu gestalten. Die Papierkarten von Flinders Technology Associates (FTA cards) stellen eine Möglichkeit dar, beide Vorgänge zu vereinen und somit Nukleinsäureproben von biologischem Material im Feld zu sammeln, sicher zu transportieren, aufzubewahren und einfach für die PCR aufzuarbeiten.

In diesem Beitrag wird vergleichend untersucht, wie sich FTA Karten und andere klassische Extraktionsverfahren zum Nachweis von pflanzenpathogenen Viroiden, Viren, Bakterien und Pilzen mit Hilfe von RT-PCR oder PCR eignen.

077 - Drechsler, N.<sup>1)</sup>; Habekuß, A.<sup>2)</sup>; Thieme, T.<sup>1)</sup>; Schubert, J.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Bio-Test Labor GmbH Sagerheide; <sup>2)</sup> Julius Kühn-Institut

### **Nachweis von BYDV-PAV in Getreideproben**

Detection of BYDV-PAV in cereal samples

Das *Barley yellow dwarf virus* (BYDV, Luteoviridae) ist eines der bedeutendsten Getreideviren weltweit. In Deutschland verursacht vor allem der Stamm BYDV-PAV, übertragen von den Aphidenarten *Rhopalosiphum padi* L. und *Sitobion avenae* F., erhebliche Ertragsverluste in Wintergetreide. Den größten Schaden verursachen Infektionen im Herbst, dabei variieren die Befallsraten von Jahr zu Jahr witterungsabhängig stark.

Die Untersuchung von Feldproben mit dem ELISA gibt Auskunft über die Befallslage und den Erfolg von vorbeugenden Insektizidbehandlungen zur Vektorenbekämpfung. Um Aufwand und Kosten der Analysen zu minimieren, wird gefordert, dass mehrere Pflanzenproben eines Feldes für den Virustest zusammengefasst werden. Es wurde ein preisgünstiges RT-Realtime-PCR-Verfahren entwickelt, das den spezifischen Nachweis von BYDV-PAV auch bei geringer Viruskonzentration ermöglicht. Das Verfahren basiert auf dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen. Parallel dazu wurde aber auch eine spezifische und sensitive TaqManSonde für BYDV-PAV entwickelt. Es wurde untersucht, wie viele Pflanzen zusammengefasst werden können, ohne die Nachweissicherheit zu gefährden. Zum direkten Vergleich zwischen ELISA und PCR wurde Pflanzensaft infizierter und nicht infizierter Pflanzen vermischt und in Verdünnungsreihen analysiert. Mit der PCR konnten PAV-positive Pflanzen auch bei einer 1:1000 Verdünnung sicher nachgewiesen werden, während im ELISA die Nachweissicherheit bereits bei einer 1:100 Verdünnung deutlich nachlässt. Da das Verfahren für die Massentestung adaptiert wurde, kann es für umfangreiche Analysen genutzt werden.

078 - Menzel, W.; Winter, S.  
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

### **Untersuchungen zur Samen- und Blattlausübertragbarkeit des *Potato spindle tuber viroid***

Investigations on seed- and aphid-transmissibility of *Potato spindle tuber viroid*

Das *Potato spindle tuber viroid* (Pospiviroid, PSTVd, EPPO A2 Liste) wurde in den letzten Jahren vermehrt in verschiedenen Zierpflanzen und auch Tomate nachgewiesen, wobei die Herkunft oft ungeklärt blieb. Angaben in der Literatur zu möglichen Übertragungswegen sind teils widersprüchlich. In Versuchen mit selbst erzeugtem Saatgut von infizierten Tomatenpflanzen konnte eine Samenübertragbarkeit von 6 bis 16 % festgestellt werden, wohingegen der Nachweis des PSTVd bei Testung von Einzelsamen mittels real-time RT-PCR immer positiv war.

In Mischungen mit Saatgut gesunder Tomatenpflanzen war ein zuverlässiger Nachweis von 10 infizierten in 1000 Samen eindeutig möglich, allerdings konnten auch in höheren Mischungsverhältnissen von 1 in 1000 Samen teilweise gute Ct-Werte erhalten werden. Die Variabilität liegt hier vermutlich in der nicht vollständigen Homogenisierung der 1000 Samen bei der RNA Extraktion begründet. Verschiedene Saatgutbehandlungsansätze (Tri-Natriumphosphat, Pektinase/HCl, Menno Florades) zur Inaktivierung des Viroids waren nicht erfolgreich. Versuche zur Blattlausübertragbarkeit (*Myzus persicae*) in Mischinfektion mit dem *Potato leaf roll virus* zwischen *Physalis* Pflanzen waren ebenfalls erfolgreich. Auch in einer PLRV Virusreinigung aus mischinfizierten Pflanzen konnte das PSTVd nachgewiesen werden, was auf eine heterologe Enkapsidierung schließen lässt.

079 - Preiss, U.; Fabich, S.; Mather-Kaub, H.; Albert, G.; Keuck, A.  
Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück

### ***Stolbur*-Phytoplasma an Kartoffeln**

Potato *Stolbur* of Potatoes

In 2007 wurde das *Stolbur*-Phytoplasma erstmals in Rheinland-Pfalz festgestellt. Die befallenen Anbauflächen und deren Umfeld wurden von 2007 bis 2010 überwacht. Dadurch konnten umfassende Kenntnisse zum Erregerauftreten und im diagnostischen Bereich gesammelt werden. In einem Symptomkatalog wurden die Schadbilder wie z. B. Anthocyaneinlagerungen, Triebsucht durch übersteigerte Bildung von „Geizen“ in den Blattachsen, Welkeerscheinungen oder Gummiknollenbildung zusammengestellt. Die symptomatische Entwicklung beginnt ca. vier Wochen nach der Infektion und bereits zwei Wochen später können erste Pflanzen abgestorben sein. Einige Kartoffelstauden reagieren lediglich mit einer Habitusveränderung. Das Erntegut solcher Pflanzen bleibt zum Teil *Stolbur*-unbelastet. Neben der visuellen Diagnose ist die PCR-Technik für eine sichere Bestimmung von übergeordneter Bedeutung. Bereits bei der DNA-Isolation des *Stolbur*-Phytoplasmas zeigen sich Unterschiede bei den DNA-Konzentrationen und in der Nachweisbarkeit in den verschiedenen Pflanzenteilen. Mittels eigener erstellter Primer fUFab/rUFab (Fabich 2009) und fstol/rstol (Maixner et al., 1995) sowie fTuf AY/rTuf AY (Schneider et al., 1997) wurden symptomtragende Kartoffelpflanzen und auch Wirtspflanzen eingehend untersucht. Am und im Acker wurden potentielle Wirtspflanzen wie beispielsweise *Cirsium arvense*, *Polygonum aviculare*, *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Matricaria chamomilla* beprobt. Mehrjährige und überjährige Pflanzen können Zikaden, den Vektoren des *Stolbur*-Phytoplasmas, als Wirtspflanzen dienen. An diesen Pflanzen können sich die jungen Zikaden mit dem Pathogen beladen und es dann bei ihren Saugaktivitäten verbreiten. Die Untersuchungen aus den Befallsgebieten zeigen, dass symptomtragende Wildkräuter vom Ackerrand häufig mit Phytoplasmen belastet sind, welche aber nicht zwangsläufig der *Stolbur*gruppe zugeordnet werden können.

Diese Erfahrung hebt die Bedeutsamkeit einer genauen PCR-Diagnose hervor. Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen liegt im Bereich des Vektorenauftretens. In den Befallsgebieten wurde begonnen das Vorkommen von *Hyalesthes obsoletus* und anderer Zikaden zu erfassen, um Aufschluss über die Verbreitung und somit über mögliche Gegenmaßnahmen zu bekommen.

080 - Cernusko, R.; Wolf, C.; Höber, S.  
Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern

### **Optimierung und Einführung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* in Kartoffeln**

Optimisation and implementation of a multiplex real-time PCR for the detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato

Bei der Zertifizierung von Pflanzkartoffeln wird im Rahmen des Anerkennungsverfahrens auf Befallsfreiheit durch die Erreger der Bakteriellen Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* – Cms) und Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum* – Rs) untersucht. Die bisher angewandten Nachweismethoden sind Immunfluoreszenztest und konventionelle PCR. Bei der PCR wurden beide Bakterien in separaten Ansätzen getestet. Das Anliegen dieser Arbeit war, mit Hilfe der neu entwickelten Multiplex Real-Time PCR beide Erreger zuzüglich einer internen Extraktions- und Amplifikationskontrolle gleichzeitig zu erfassen. Es wurden folgende Primer-/Sondenkombinationen getestet:

- *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*: Cms 50-2F/Cms 133R + Cms 50-53T [1];
- *Ralstonia solanacearum*: RS-I-F/RS-II-R + RS-P und B2-I-F/B2-II-R + B2-P [2];
- interne Kontrolle (COX-Cytochrom Oxidase Gen): COX-F/COX-R + COX-P [2].

Zunächst wurden die TaqMan Sonden für beide Bakterien und für die interne Kontrolle mit verschiedenen Reporter-Fluoreszenzfarbstoffen und Quenchern markiert und einzeln auf ihre Sensitivität getestet. Anschließend wurden alle drei PCR zusammengeführt und die Sensitivität in einer Triplex PCR erneut überprüft.

Beide Erreger konnten bei einer Konzentration von 1000 cfu/ml in einem Kartoffelextrakt sicher nachgewiesen werden (ct-Werte für Cms = 34 bzw. für Rs = 36). Bei *Ralstonia solanacearum* waren beide Primer-/Sondenkombinationen für den zuverlässigen Nachweis geeignet. Die interne Kontrolle (COX) erlaubte eine Überprüfung der Extraktion sowie der Amplifikation, wobei ab einem ct-Wert von 16 - 26 die Probe als nicht inhibiert beurteilt wurde.

In Paralleluntersuchungen mit der konventionellen PCR wurde nachgewiesen, dass die Real-Time PCR eine gleiche bzw. höhere Sensitivität aufweist. Gleichzeitig konnte das Kontaminationsrisiko reduziert und eine erhebliche Zeit- und Arbeitsersparnis erreicht werden.

Die von uns entwickelte Multiplex PCR stellt vor allem durch die hohe Sensitivität und Spezifität eine deutliche Verbesserung der Pathogendiagnostik in der Laborroutine dar und kann zur Erhöhung der Ergebnissicherheit einen wichtigen Beitrag leisten.

#### Literatur

- [1] Schaad, N. W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A., Knorr, D. (1999): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato Tubers by BIO-PCR and an Automated Real-Time Fluorescence Detection System. *Plant Disease* (83), 1095-1100.
- [2] Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., Stead, D. E. (2000): Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 2853-2858.

081 - Werres, S.  
Julius Kühn-Institut

### **Einfluss des Nährmediums auf die Entwicklung von *Phytophthora*-Arten *in vitro*** Influence of the agar medium on the development of *Phytophthora* species

In der Literatur zur Kultivierung von *Phytophthora*-Arten wird immer wieder V8-Gemüsesaft angegeben. Dieser Gemüsesaft ist aber nicht immer zu bekommen. In Versuchen wurde daher die Eignung von neun Gemüsesäften untersucht. Als Kontrollmedium diente Möhrenschnitzelagar. Die Untersuchungen erfolgten mit drei *Phytophthora*-Arten. Bonitiert wurde die Eignung der Säfte auf die vegetative Wachstumsrate sowie die Bildung, Größe und Form von Sporangien, Chlamydosporen und Oogonien/Oosporen. Die ersten Ergebnisse zeigten einen starken Einfluss des Gemüsesafts. In Abhängigkeit vom Isolat veränderte sich die Form und Größe der Sporangien signifikant. Einige Medien unterdrückten die Sporangien-, Chlamydosporen- oder Gametangienbildung.

082 - Bogs, C.; Wielgoss, A.; Nechwatal, J.; Mendgen, K.  
Universität Konstanz

### **Seasonal infection pressure of *Phragmites australis* associated *Pythium* species in littoral water**

We have investigated oomycete communities infecting and degrading reed leaves at Lake Constance, Germany. Twenty-five different reed-associated oomycete species could be identified and differentiated according to their substrate preferences. Saprophytic species colonising dead host material and reed-pathogens preferring fresh substrate showed different distribution patterns over three seasons. We found evidence for specific niche differentiation within the reed associated pathogens mediated by seasonal influence. For example, the newly described reed pathogen *Pythium phragmitis* was present in fresh reed leaves in May and October, but absent in August when it was replaced by another species. We investigated the correlation between the infestation of reed leaves and the number of zoospores in littoral water of Lake Constance throughout the year. A simultaneous study on reed leaf colonization by two *Pythium* species and their zoospore densities in surrounding water was performed. Both species were previously shown to be among the most abundant reed-associated species in their niches. The reed pathogen *P. phragmitis* was a frequent colonizer of green reed leaves, whereas the saprophytic species *P. catenulatum* was a predominant colonizer of dead leaf baits. A Sybr Green based real-time PCR assay with specific primers located in the ITS region for each species was established.

For *P. phragmitis*, we showed that the pathogen was present all over the year, with zoospore densities in August similar to those in October, when it was highly abundant in fresh reed leaves. Thus, the amount of zoospores in the

water did not correlate with detected DNA-quantities in host tissue. That also applied to the saprophyte *P. catenulatum*. Its zoospore numbers showed peaks in May and October in littoral water, while in green leaf baits it was hardly present with a significant increase in autumn. The level of zoospore numbers of *P. catenulatum* was about fourfold higher than that of the reed pathogen *P. phragmitis*. In both species, a reduced zoospore production could be detected in summer. Both species showed no correlation between the number of zoospores in littoral water and the establishment of hyphae in plant material.

Our data indicate that the colonisation of reed by oomycete communities was influenced by abiotic factors such as water chemistry, temperature and wave action. Also biotic factors such as the condition of the host material (leaf age, leaf wounds, plant stress level), and positive or negative interactions with other microorganisms could be responsible for the low infection rates in presence of high numbers of zoospores.

083 - Wunderle, J.; Leclerque, A.; Koch, E.  
Julius Kühn-Institut

### **Verfahren zum Nachweis des Flugbranderregers (*Ustilago nuda*, *U. tritici*) in Jungpflanzen** Methods for diagnosis of the loose smut pathogens *Ustilago nuda* and *U. tritici* in young plants

Im Ökolandbau gibt es derzeit neben der Warmwasserbeize kein verlässliches Verfahren zur Saatgutbehandlung gegen die samenbürtigen Flugbranderreger *Ustilago nuda* und *U. tritici*. Im Rahmen eines vom Bundesprogramm Ökologischer Landbau geförderten Projektes sollen daher neuartige, für den Ökolandbau geeignete Behandlungsmittel entwickelt werden. Um den Zeitraum zwischen Saatgutbehandlung und Befallsbonitur (normalerweise anhand des Ährenbefalls) zu verkürzen, sollen zunächst Verfahren für einen Frühnachweis in jungen Getreidepflanzen erarbeitet werden. Diese Methoden sollen es ermöglichen, eine große Anzahl potentieller Saatgutbehandlungsmittel, wie Kulturfiltrate von Mikroorganismen oder Pflanzenextrakte, in Gewächshaustesten zu überprüfen.

Hierzu wurden ein quantitatives (ein auf polyklonalen Antikörpern basierender ELISA) und ein qualitatives Verfahren (mikroskopischer Nachweis mit dem Fluoreszenzfarbstoff Blankophor) getestet und miteinander verglichen. Es wurden jeweils Untersuchungen zum 1-Blatt- (EC 11), zum 3-Blatt- (EC 13) und zum 1-Knoten-Stadium (EC 31) durchgeführt. Darüber hinaus wird zurzeit an einem Nachweis über Real-Time-PCR gearbeitet.

Es zeigte sich, dass das 1-Blatt-Stadium als Boniturtermin für den ELISA ungeeignet war, da der Pilz in infizierten Pflanzen zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht in ausreichender Menge in den Vegetationspunkt hineingewachsen war. Dagegen war zum 3-Blatt-Stadium und zum 1-Knoten-Stadium eine Unterscheidung in „gesund“ oder „infiziert“ mit dem ELISA problemlos möglich. Der Gehalt an *U. nuda*-Protein pro Gramm Frischgewicht lag in den als „infiziert“ eingestuft Pflanzen oft im zweistelligen µg-Bereich. Zu diesen Stadien war der Pilz so massiv im Gewebe vorhanden, dass auch der mikroskopische Nachweis eindeutig war.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich für Wirksamkeitsversuche mit Sommergerste das 3-Blatt-Stadium für den Nachweis via ELISA und Mikroskopie anbietet. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob eine Detektion über ein RT-PCR-Verfahren schon früher möglich ist. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Nachweisgrenze mit der RT-PCR deutlich niedriger liegt als mit dem ELISA. Mit ELISA und Mikroskopie kann derzeit eine sichere Bonitur frühestens 10 bis 14 Tage nach der Aussaat erfolgen, also knapp zwei Wochen vor dem 1-Knoten-Stadium und (im Falle von Sommergerste) 8 bis 10 Wochen vor dem Termin des Ährenschiebens, zu dem normalerweise die Befallsfeststellung erfolgt.

084 - Koch, E.<sup>1)</sup>; Spieß, H.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Julius Kühn-Institut; <sup>2)</sup> Institut für Biologisch-Dynamische Forschung, Außenstelle Dottenfelderhof

### **Inokulationsverfahren zur Erzeugung von Saatgut mit Flugbrandbefall (*U. nuda*, *U. tritici*)** Inoculation methods for the production of seed infected with loose smut (*U. nuda*, *U. tritici*)

Eine Voraussetzung für die Arbeit mit samenbürtigen Erregern ist die Verfügbarkeit von ausreichend infiziertem Saatgut. Bei den Krankheitserregern, deren Vermehrungseinheiten außen am Saatgut haften, ist in vielen Fällen eine künstliche Inokulation des Saatgutes ohne weiteres möglich (z. B. Steinbrand, *Tilletia tritici*). Beim Flugbrand der Gerste und des Weizen (*Ustilago nuda* bzw. *U. tritici*) ist diese Möglichkeit nicht gegeben. Bei ihnen erfolgt die Infektion zur Zeit der Getreideblüte. Die Brandsporen dringen über die Fruchtknotenwand in den Fruchtknoten ein und besiedeln den Embryo, insbesondere das Skutellum. Der Befall des Embryos lässt sich mikroskopisch diagnostizieren („Embryotest“). Der Infektionsgrad von natürlich befallenem Gersten- und Weizensaatgut mit

Flugbrand liegt häufig im Bereich von 1-3 % oder darunter. Dieser Befall ist für die Erzielung aussagekräftiger Ergebnisse in Kleinparzellenversuchen, insbesondere aber in Gewächshausversuchen nicht ausreichend.

Um zu überprüfen, ob sich durch künstliche Inokulation mit Flugbrandsporen der Befallsgrad erhöhen lässt, wurden entsprechende Versuche im Freiland durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde Sommergerste zum Zeitpunkt der Blüte über einen Zeitraum von 14 Tagen hinweg drei Mal täglich mit einer Sporensuspension in Wasser (1 g/l + 0,01 % Tween 20) besprüht. Der Embryotest ergab, dass diese Art der Inokulation zu keiner signifikanten Erhöhung des Befalls führte. In weiteren Untersuchungen wurden Sporensuspensionen in Wasser mit einer Farbspritzpistole appliziert oder die Sporen wurden mit verschiedenen Verfahren trocken ausgebracht. In dieser Versuchsreihe wurden an Winterweizen die besten Ergebnisse mit den Verfahren „Stäuben“ und „Farbspritzpistole“ erzielt (Steigerung des Befalls von 2,3 % in „Unbehandelt“ auf jeweils 6 %). In weiteren Versuchen wurden Blütcheninokulationen mit verschiedenen Sporenkonzentrationen durchgeführt. Bei diesem Verfahren, das sich für die Herstellung hoch infizierter Saatgutchargen eignet, wird eine Sporensuspension mit der Kanüle einer Spritze auf den Fruchtknoten appliziert. An Sommergerste wurden nach Inokulation mit Sporenkonzentrationen von  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  pro ml Befallsgrade von 52 %, 54 % bzw. 63 % ermittelt. Gleichzeitig sank die Keimfähigkeit von 75 % (bei  $2 \times 10^4$ ) auf 46 % (bei  $2 \times 10^6$ ). Ein prinzipiell gleiches Ergebnis wurde mit Wintergerste erzielt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die negative Korrelation zwischen Befallsgrad und Keimfähigkeit beim Weizen weniger stark ausgeprägt ist. Die Arbeiten werden fortgesetzt.

085 - Niepold, F.  
Julius Kühn-Institut

### **Pathogenitäts-korrelierte Einordnung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* aus der JKI Stammsammlung aufgrund des Methylierungsgrades vom CD-Chromosom**

Pathogenicity correlated classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* from the JKI strain collection on the basis of the methylation of its CD chromosome

Bei *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* wird die Pathogenität gegenüber Tomaten durch ein sogenanntes CD (conditional dispensable)-Chromosom codiert, das während der Evolution bereits mehrere Male an *Fusarium oxysporum* sp. im Boden transferiert worden ist. Beispielhaft wurden zehn *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Isolate aus der JKI-Stammsammlung mit *Fusarium*-spezifischen Primern auf ihren unterschiedlichen genetischen Hintergrund untersucht. Dabei ließen sich zwei verschiedene *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-Typen bestimmen, in denen sich das CD-Chromosom befand. Um bei der heterogenen *Fusarium oxysporum*-Gruppe auch die epigenetischen Einflüsse für eine Unterscheidung zu berücksichtigen, werden mit Restriktionsanalysen Methylierungen des CD-Chromosoms nachgewiesen. Eine anschließend durchgeführte PCR zeigt an, ob bestimmte DNA-Bereiche methyliert sind, da beispielsweise bei einer Cytosin Methylierung das Restriktionsenzym HpaII (Erkennungssequenz: CCGG) nicht schneidet, während das Enzym MspI (Isoschizomer) an der gleichen Restriktionsschnittstelle schneiden kann. Diese Methode wird auch bei anderen Fusarien angewendet, um so eine zusätzliche Unterscheidung von Pilzisolaten für die JKI-Stammsammlung zu erreichen.

086 - Strehlow, B.<sup>1)</sup>; Preiß, U.<sup>2)</sup>; Horn, R.<sup>1)</sup>; Struck, C.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Universität Rostock; <sup>2)</sup> Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück

### **Genetische Variabilität des Kohlhernie-Erregers *Plasmodiophora brassicae* in verschiedenen Regionen Deutschlands**

Genetic variability of the causing agent of clubroot, *Plasmodiophora brassicae*, in different regions of Germany

Durch die Intensivierung des Rapsanbaus treten verstärkt Fruchtfolgekrankheiten auf. Dazu gehört u. a. die Kohlhernie, die von dem obligat biotrophen, im Boden lebenden Parasiten *Plasmodiophora brassicae* verursacht wird. Eine Bekämpfung des Erregers ist nicht möglich und der Befall kann durch Kulturmaßnahmen nur einschränkt, jedoch nicht vollkommen verhindert werden. Eine Maßnahme, den Kohlhernieerreger effektiv zu kontrollieren, wäre der Anbau resistenter Rapssorten. Die Entwicklung resistenter Wirtspflanzen wird durch die hohe Anzahl auftretender Pathotypen und fehlender effizienter Differenzierungsmethoden erschwert. Bisher erfolgt die Charakterisierung der Pathotypen anhand ihrer Virulenzeigenschaften mithilfe eines sehr arbeits-, platz- und zeitaufwendigen Differentialsets (European Clubroot Differential, ECD) unterschiedlich resistenter Wirtspflanzen. Wesentlich effizienter könnte dies mit DNA-Fingerprinttechnik erreicht werden.

Wir haben einen AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Ansatz genutzt, um die genetische Variabilität des Erregers zu erfassen. Die AFLP-Rohdaten (Bandenmuster) wurden von Hand editiert und eine binäre Datenmatrix erstellt. Um Fehler, die durch Verunreinigungen mit Raps-DNA entstehen können, zu vermeiden, wurden ausschließlich Banden berücksichtigt, die nicht im Rapsgenom auftraten. Nur deutlich sichtbare Banden mit einer Größe zwischen 50 und 500 bp wurden ausgewertet. Von den getesteten Primerkombinationen konnten nur einige ausgewertet werden. Mit distanz- und vektorbasierten Multivariaten Analysen wurden phylogenetische Stammbäume bzw. Ordinationsgraphen erstellt.

Die untersuchten Feldisolate stammen aus verschiedenen Rapsanbaugebieten Deutschlands. Es wurde ein hoher Polymorphiegrad ermittelt. Die Feldisolate lassen sich größtenteils in geografische Gruppen nach den Bundesländern einteilen. Innerhalb der Bundesländer konnte keine geografische Gruppenbildung festgestellt werden. Die Feldisolate aus Rheinland-Pfalz stellten sich, basierend auf der binären Datenmatrix, homogener dar. Um eine bessere Auflösung der phylogenetischen Bäume bzw. Ordinationsgraphen zu erreichen, sollen zusätzliche Merkmale und zusätzliche Feldisolate untersucht werden. Außerdem soll neben der großräumigen Pathotypenverteilung die genetische Variabilität auf einem Feld und innerhalb einer Wurzelgalle ermittelt werden.

Das Ziel ist es, genetische Marker zu identifizieren, mit denen Pathotypen von *Plasmodiophora brassicae* verschiedener Herkünfte unterschieden werden können.

087 - Bojahr, J.<sup>1)</sup>; Strehlow, B.<sup>1)</sup>; Diederichsen, E.<sup>2)</sup>; Struck, C.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Universität Rostock; <sup>2)</sup> Freie Universität Berlin

### **Entwicklung eines semi-quantitativen PCR-gestützten Nachweises von infektiösen *Plasmodiophora brassicae*-Sporen in Bodenproben**

Development of a semi-quantitative PCR-based detection of infectious *Plasmodiophora brassicae* spores in soil

Kohlhernie, verursacht durch den bodenbürtigen Erreger *Plasmodiophora brassicae*, ist eine ökonomisch wichtige Krankheit an Raps und anderen *Brassica*-Arten. Die chemische Bekämpfung des Erregers ist derzeit nicht möglich. Eine Kontrolle ist ausschließlich über pflanzenbauliche Maßnahmen zu erreichen sowie über die Verwendung resistenter Sorten.

Zur Prüfung der Bodenverseuchung mit *P. brassicae* werden sehr zeitaufwendige Biotests im Gewächshaus durchgeführt. Wesentlich effizienter sind PCR-gestützte Tests zum Nachweis der *P. brassicae*-DNA aus Bodenproben. Ein entscheidender Nachteil hierbei ist, dass die DNA toter, nicht keimfähiger Sporen nicht von der DNA infektiöser Sporen unterschieden wird und es daher zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

Wir stellen hier ein Detektionsverfahren vor, bei dem der Biotest zum Nachweis des Erregers mit dem PCR-basierten Test kombiniert wird, indem die DNA aus den Wurzeln der Testpflanzen sechs Tage nach Inokulation mit spezifischen *P. brassicae*-Primern untersucht wird. Auf diese Weise werden indirekt ausschließlich die infektiösen Sporen des Kohlhernieerregers nachgewiesen.

Die sechs Tage inokulierten Testpflanzen wurden mit *Plasmodiophora brassicae*-spezifischen ITS-Primern getestet. Aus ersten Rapswurzeln konnte PCR-gestützt der Kohlhernieerreger nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen zur Detektierbarkeitsgrenze per PCR, konnte keine *P. brassicae*-DNA bei Sporenkonzentrationen von 100 bis 100000 pro Topf detektiert werden. Der gleichzeitig ablaufende Biotest zeigte ab 10000 Sporen pro Topf *P. brassicae* Symptome. Eine PCR-basierte Diagnose nach sechs Tagen erscheint zu früh, um einen sicheren *P. brassicae* Nachweis durchzuführen.

088 - Ali, A., Wolf, P.F.J., Verreet, J.-A.

Christian-Albrecht-Universität Kiel

### **Rapid detection methods (realtime-PCR ELISA) for *Cercospora beticola* in soil**

*Cercospora* leaf spot (CLS), caused by the fungus *Cercospora beticola*, belongs to the most common and destructive foliar disease in sugar beet worldwide resulting in severe reduction in sugar beet yield. The fungus survives in winter as stromata in soil, which germinate under certain conditions producing conidia that act as primary inoculum for infection of sugar beet. The objective of this project was to develop reliable diagnostic methods for early detection of the fungal inoculum in soil in order to improve predictions of disease onset within an integrated disease management system. Soil samples were collected from sugar beet growing fields in Germany including Bavaria and Lower Saxony. As a result, a PCR-based detection system has been established and

successfully used for qualitative and quantitative detection. Total DNA was isolated from the soil samples, from which the presence as well as the amount of *Cercospora* could be easily and efficiently determined by PCR or qPCR with *Cercospora beticola*-specific primers, respectively. In addition, a set of *C. beticola*-specific monoclonal antibodies has been generated and the establishment of an ELISA technique-based detection system is in progress.

089 - Hirsch, J.<sup>1)</sup>; Reineke, A.<sup>1)</sup>; Sprick, P.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Forschungsanstalt Geisenheim; <sup>2)</sup> Curculio Institute

### **DNA-Barcoding für Rüsselkäferlarven: ein molekulares Diagnoseverfahren zur Artbestimmung von Rüsselkäfern im Pflanzenschutz**

Vertreter aus der Familie der Rüsselkäfer (Coleoptera: Curculionidae) verursachen durch Wurzelfraß im Larvalstadium weltweit einen wirtschaftlichen Schaden an zahlreichen gartenbaulichen Kulturen. Neben der bekanntesten Art, dem Gefurchten Dickmaulrüssler *Otiorhynchus sulcatus*, treten dabei verschiedene weitere Arten zunehmend als Schaderreger in Erscheinung (Sprick 2009). Obwohl sich die adulten Tiere morphologisch gut unterscheiden lassen, ist die Artbestimmung der Larven und Puppen nahezu unmöglich. Da jedoch jede Art ihre eigene Phänologie und Sensitivität gegenüber Pflanzenschutzmitteln aufweist, ist die Artbestimmung eine Grundvoraussetzung zur Anwendung von effizienten Bekämpfungsstrategien.

Aus diesem Grund wurde ein diagnostisches Verfahren auf Basis von PCR-RFLPs entwickelt, das es ermöglicht, 16 *Otiorhynchus*- und acht weitere Rüsselkäferarten unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium zu unterscheiden (Gosik et al. 2010, Hirsch et al. 2010). Dazu wurde von 143 Rüsselkäfern ein Fragment der Cytochromoxidase Untereinheit II (COII) mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert und anschließend mit maximal vier Restriktionsenzymen geschnitten. Nach elektrophoretischer Auftrennung der erzeugten Fragmente erhält man ein artspezifisches Bandenmuster, das zur sicheren Artbestimmung herangezogen werden kann.

#### Literatur

- Gosik, R., Hirsch, J., Sprick, P. (2010): Description of the mature larva and pupa of *Pachyrhinus lethierryi* (Desbrochers, 1875) (Coleoptera, Curculionidae: Entiminae: Polydrusini) with comments on its biology. SNUDEBILLER 11 - Studies on taxonomy, biology and ecology of Curculionidae, in press, Mönchengladbach.
- Hirsch, J., Sprick, P., Reineke, A. (2010): Molecular identification of larval stages of *Otiorhynchus* (Coleoptera: Curculionidae) species based on PCR-RFLP analysis. J. Econ. Entomol., in press.
- Sprick, P. (2009): Monitoring von Rüsselkäfern in Baumschulen, Staudengärtnereien und Hopfengärten - Ergebnisse des ersten Untersuchungsjahres (2008). Mitt. Dtsch. Ges. allg. angew. Ent. 17: 197-205.

### **Wirt-Parasit-Beziehungen**

090 - Kang, S.Y.; Ko, P.Y.; Go, Y.J.; Kim, R.K.; Kim, S.Y.; Son, C.H.; Jeun, Y.C.

Jeju National University, South Korea

### **Induced systemic resistance mediated by rhizobacteria isolated from Jeju Island against various plant diseases**

The efficacies of resistance induced by rhizobacteria isolated from the rhizosphere of the annual plants growing in Jeju Island were investigated. Total 11 bacterial isolates were selected from over 100 bacterial isolates after testing of resistance induction or biological control efficacy against various plant diseases. Among the selected bacterial isolates 5 isolates belonged to genus *Bacillus*, 3 isolates were *Burkholderia gladioli*. Pre-inoculation with *Bacillus cereus* TRL2-3 and *Burkholderia gladioli* TRK2-2, which were isolated from the island, on cucumber plants were mediated resistance against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*.

Both bacterial isolates and *B. cereus* MRL412, *B. circulans* BRH433-2, *B. weihenstephanensis* MRL409-2 and *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2 suppressed effectively the late blight disease caused by *Phytophthora infestans* in potato plants, as well.

In tomato plants *B. cereus* MRL412, *B. gladioli* TRH423-3, *Miamiensis avidus* TRH427-2, *Acinetobacter quenososp* KRJ502-1 and *B. cereus* KRY505-3 mediated resistance against the late blight disease. Also, most of the effective bacterial isolates could induce systemic resistance in pepper plants, including *B. cereus* MRL412, *B. cereus* KRY505-3, *Bur. gladioli* TRH423-3, *B. circulans* BRH433-2, *B. weihenstephanensis* MRL409-2, *Bur. gladioli* MRL408-3 and *P. fluorescens* TRH415-2.