

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.¹⁾; Reineke, A.¹⁾; Sprick, P.²⁾

¹⁾ Forschungsanstalt Geisenheim; ²⁾ 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.

On the other hand, some bacterial isolates revealed biological control efficacy in citrus fruits against late blight or canker. Spray with suspension of the bacterial isolate such as *B. cereus* MRL412, *B. cereus* KRY505-3, *Bur. gladioli* TRH423-3, *B. cereus* TRL2-3 and *B. circulans* BRH433-2 could suppress disease development of late blight in citrus fruit. Similarly, *Bur. gladioli* TRH423-3, *Bur. gladioli* MRL408-3 or *P. fluorescens* TRH415-2 could suppress citrus canker. The cytological studies using a fluorescence microscope showed that the callose formation at the pathogen penetration sites were increased on the plants pre-inoculated with bacterial isolates compared those on the untreated control plants. The increase of callose formation was observed all cases of the plants expressing induced systemic resistance (ISR) mediated by the rhizobacteria. Furthermore, ultrastructures of the leaves of ISR expressing plants were different from those in the untreated plants after challenge inoculation with pathogen. Active defense responses were observed in ISR plants, i.e. sheath formation at penetration sites and accumulation of endoplasmic reticula or numerous vesicles around intracellular hyphae. However, no these defense responses were found in untreated plants.

(Following are results of a study on the Human Resource Development Center for Economic Region Leading Industry Project, supported by the Ministry of Education, Science and Technology (MEST) and the National Research Foundation of Korea (NRF)).

091 - Hunsche, M.; Bürling, K.; Leufen, G.; Noga, G.
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Use of fluorescence techniques and scanning electron microscopy for elucidating early stages of pathogen-plant interactions

The initial stages of pathogen-plant interaction are decisive for pathogen establishment and disease severity. While fungal spores germinate on the surface and try to invade the host, the plant initiates defence mechanisms such as lignifications of affected tissues.

The outcome of this interaction i.e. the disease symptoms can be visualized several days after infection, or alternatively at earlier stages by using microscopic techniques. Aim of our study was to examine the pathogen-plant interaction by comparing microscopic techniques and non-invasive fluorescence procedures, on the example of *Puccinia triticina* inoculated on the rust-resistant wheat cultivar Retro. In parallel to visual evaluations, pathogen development was studied by scanning electron microscopy (SEM), fluorescence microscopy, imaging chlorophyll fluorescence (Imaging-PAM), and laserinduced fluorescence (LIF). Observations of inoculated plants showed first visible disease symptoms i.e. irregularly distributed chlorotic spots four days after inoculation (dai). The spots got progressively larger, conspicuous, and partially necrotic, and at 7 dai a few pustules became apparent. Using the SEM technique, spore germination and pre-penetration stages could be studied, as well as the final infection stage, when the leaf tissue of infected regions was already damaged and pustules became apparent. Fluorescence microscopic examinations showed lignifications of the surrounding cells to the penetration site (2 dai). At a later stage (8 dai), lignin accumulation was observed in the whole affected tissue.

As a non-destructive measuring system, Imaging-PAM readings enabled the spatial and temporal analysis of chlorophyll fluorescence. In the present study the parameter Y (NO) was the more sensitive one to indicate physiological changes at initial stages revealing modifications already 2 dai. In parallel, LIF recordings indicated changes in spectral signatures and fluorescence mean lifetime. LIF recordings showed distinct spectral signatures on healthy and infected plants 2 dai, resulting in alterations of specific fluorescence ratios. Furthermore an elongation of mean lifetime in selected wavelengths was registered. Summarizing, both evaluated non-destructive fluorescence techniques, Imaging-PAM and laserinduced fluorescence, are well suited for early detection of *P. triticina*. The *in vivo* measurements enable time-series evaluations of physiological modifications as related to plant defence and pathogen development. Hence, these techniques might be used as additional tools for a better understanding of pathogen-plant interactions on genotypes differing in their sensitivity to pathogen strains in the context of breeding programs.

092 - Klocke, B.; Flath, K.
Julius Kühn-Institut

Mehltau an *Triticale* – neue Herausforderung für Züchtung und Anbau Powdery mildew on *Triticale* – new challenge for breeding and cultivation

Triticale galt lange Zeit als „Gesundfrucht“, deren Anbauwürdigkeit sich auch in der geringen Krankheitsanfälligkeit begründete.

Im Jahr 2004 zeigte sich erstmals eine zunehmende Anfälligkeit einiger Triticalesorten gegenüber Echtem Mehltau, *Blumeria graminis* DC. In den Folgejahren trat die Krankheit in vielen Regionen Deutschlands epidemisch auf. Auf den Einsatz von Fungiziden kann in den nächsten Jahren nicht mehr verzichtet werden, was jedoch innerhalb weniger Jahre zur Entstehung von Fungizidresistenzen führen könnte. Erste Befunde Strobilurin-resistenter Triticalemehltauisolate liegen bereits vor. Aus diesem Grund sind sowohl eine gezielte Resistenzzüchtung als auch die Überwachung der Pathogenpopulation notwendig, um das Auftreten neuer Pathotypen frühzeitig zu erkennen und die Wirksamkeit rassenspezifischer Resistenzen einzuschätzen.

Im Rahmen eines vom BMELV geförderten Forschungsprojektes sollte neues, mehlttauresistentes Ausgangsmaterial für die praktische Züchtung bereitgestellt werden, um die Widerstandsfähigkeit deutscher Triticalesorten zu erhöhen und Erträge langfristig zu sichern.

Zur Abschätzung der Wirksamkeit und Dauerhaftigkeit dieser neuen Resistenzquellen erfolgte in den Jahren 2007 bis 2009 eine Pathosystemanalyse, bei der sowohl die Pathogenpopulationen als auch die Sortenresistenzen untersucht wurden.

Mit Infektionsversuchen wurde zunächst die Wirtsspezifität des Pathogens untersucht. Es sollte geklärt werden, ob der auf *Triticale* beobachtete Befall durch Weizen- oder Roggenmehltau verursacht wird oder ob es sich hierbei um eine eigenständige Mehltauart handelt. Blattsegmenttests mit von Weizen, Roggen und *Triticale* isoliertem Mehltau ergaben, dass von den getesteten 61 Triticalesorten nur einige wenige überhaupt von Weizen- und Roggenmehltau befallen wurden. Der Triticalemehltau konnte hingegen die Mehrzahl der Weizensorten, aber nur wenige Roggensorten befallen. Daraus lässt sich schließen, dass Triticalemehltau vermutlich aus Weizenmehltau entstanden ist, der sich speziell an diesen neuen Wirt angepasst hat.

Zur Analyse der Virulenzsituation des Triticalemehltaus in den wichtigsten deutschen Anbauregionen wurden 694 Einpustelisolate (EPI) hergestellt. Blattsegmenttests mit einem Differenzialsortiment aus 20 ausgewählten Triticalesorten konnten die untersuchten EPI insgesamt 272 unterschiedlichen Pathotypen zuordnen. Die Komplexität (= Anzahl der Virulenzfaktoren) der Isolate schwankte zwischen 6 und 19 von 20 möglichen Virulenzen. Als Maßzahl für die Verschiedenheit aller getesteten EPI wurde der Simpson-Index berechnet, der mit einem Wert von 0,97 eine hohe Diversität der deutschen Triticalemehltaupopulation dokumentiert.

Aus den gewonnenen EPI ließ sich ein Sortiment von 20 Isolaten mit unterschiedlicher Virulenz zusammenstellen, das zur Identifizierung und zur Überprüfung der Wirksamkeit von Mehlttauresistenzen genutzt werden kann.

Um die Sortenresistenzen einschätzen zu können, wurde zunächst das Sortiment der zugelassenen Triticalesorten mit insgesamt 694 Triticalemehltauisolaten im Keimlingsstadium geprüft. Nur die Sorte 'Grenado' erwies sich als vollständig resistent gegen alle getesteten Isolate. Zusätzlich wurden 826 vorselektierte Triticalelinien unterschiedlicher Zuchtfirmen mittels Blattsegmenttest mit sechs hochvirulenten Isolaten im Primärblattstadium geprüft. Dabei erwiesen sich nur 16 (= 2 %) der Linien als vollständig resistent. Zur Beurteilung der Adultpflanzenresistenz wurden 3-jährige Feldprüfungen mit künstlicher Inokulation am JKI-Standort in Berlin-Dahlem durchgeführt.

Geprüft wurde das Zuchtmaterial, das im Blattsegmenttest vollständig resistent gegen die verwendeten Isolate reagierte, die zur Zulassung beim Bundessortenamt angemeldeten Sorten sowie die aktuell zugelassenen Sorten. 2009 erwiesen sich 55 % der getesteten Zuchtstämme, 54 % der Wertprüfungssorten und 22 % der zugelassenen Sorten als mehlttauresistent.

Der zunehmende Anbauumfang von *Triticale* führte zur Anpassung der Mehltaupopulation an die rassenspezifischen Resistenzen aktueller Sorten. Im aktuellen *Triticale*-Zuchtmaterial sind Resistenzquellen mit wirksamer Keim- und Adultpflanzenresistenz verfügbar, die näher charakterisiert und für die praktische Züchtung bereitgestellt wurden. Aufgrund der hohen Diversität und Komplexität der Triticalemehltaupopulationen sollten in der Züchtung nur Stämme mit wirksamen Adultpflanzenresistenzen eingesetzt werden, um möglichst dauerhafte Resistenzen zu erzeugen.

093 - Taubenrauch, K.¹⁾; Hau, B.²⁾; Kühne, T.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Leibniz Universität Hannover

***Mycosphaerella anethi* – ein samenübertragbarer Schaderreger an Fenchel**

Mycosphaerella anethi – a seed-borne pathogen of fennel

Die Samenübertragbarkeit von *Mycosphaerella anethi* Petr. (anamorph *Passalora punctum* (Delacr.) Petzoldt an Fenchel (*Foeniculum vulgare* MILL.) ist in der Literatur bisher umstritten. Die bisherigen Einschätzungen, dass der Pilz nicht latent im Pflanzen-, Frucht- oder Samengewebe wächst, beruhen überwiegend auf nicht erfolgreichen Isolierungen des Erregers aus pflanzlichem Versuchsmaterial.

Bei der wissenschaftlichen Untersuchung des Pathosystems stellte sich heraus, dass die Inkulturnahme des Erregers aus stark befallenem Pflanzengewebe generell äußerst schwierig ist, da schnellwüchsige saprophytische Pilze die Isolate sehr leicht kontaminieren können. Problematisch ist außerdem die geringe Anzahl wüchsiger *M. anethi* Isolate nach einer starken Desinfektionsbehandlung.

Im Praxisanbau von Fenchel traten in den letzten 20 Jahren kontinuierlich hohe Ertragsausfälle (60 - 80 %) durch den *M. anethi*-Befall auf, die den Anbau stark verringerten und die Feldabstände vergrößerten. Bisher wurde angenommen, dass die Erstinfektion des Keimlings ausschließlich durch überwinternde Konidien bzw. Ascosporen von zweijährigen Pflanzen erfolgte. Eine Sameninfektion wurde ausgeschlossen, da sich die Symptome erst zur Blütezeit der Pflanzen im August zeigten. Eine Fungizidbehandlung konnte die starke epidemische Verbreitung im Bestand nur abmildern, die Fenchelfrüchte wurden trotzdem infiziert. Angesichts der deutlich reduzierten Anbauflächen und der großen Feldabstände konnte der Eintrag von Infektionsmaterial von zweijährigen Pflanzen nicht die alleinige Ursache für die aktuellen Befallsprobleme sein. Aus diesem Grund war die Klärung der Samenübertragbarkeit die wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung einer erfolgreichen Bekämpfungsstrategie.

Für die Untersuchungen wurden vier unterschiedlich stark befallene Saatgutchargen (Originalsaatgut 'Magnafena' und Nachbau aus ehemaligen Inokulations-, Isolierungs-, Fungizidparzellen eines Feldversuchs) ausgewählt. Der sichtbare Samenausgangsbefall mit *M. anethi*-Myzel wurde durch Sichtbonitur ermittelt.

Für den Erregernachweis wurden mikroskopische, serologische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden eingesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluss des Befalls auf die Keimfähigkeit untersucht. Eine negative Beeinflussung der Keimrate durch den *M. anethi*-Befall konnte nicht nachgewiesen werden. Stark befallene Früchte keimten signifikant besser als weniger stark befallene. Mikroskopische Nachweismethoden (Licht- und Rasterelektronenmikroskop) waren zur Erregeridentifizierung weniger geeignet, da eine Fremdpilzbesiedlung nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die serologische Untersuchung mit einem polyklonalen Antiserum durch Direct tissue blotting immuno assay (DTBIA) wies einen latenten Erregerbefall bei Laubblättern von Keimlingen aus Klimakammeranzucht nach. Mit serologischen (PTA-ELISA) und molekularbiologischen Methoden (PCR mit spezifischen Primern) konnte eine Infektion der grünen Früchte bzw. des Endospermgewebes der Fenchelfrüchte während der ersten Entwicklungsphase, kurz nach der Blüte, nachgewiesen werden. Äußerliche Symptome auf den Früchten wurden zu diesem Zeitpunkt nicht gebildet. Auf dem Feld gewachsene Keimlinge zeigten in der PCR einen positiven Nachweis. Der Nachbau des Erntegutes einer ehemals fungizidbehandelten Parzelle wies noch immer einen hohen Befallsgrad auf. Als Gesamtergebnis der serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen konnte die Samenübertragbarkeit von *M. anethi* zweifelsfrei nachgewiesen werden, die ursächlich für die starken Ertragsverluste im Produktionsanbau ist. Der hohe Verseuchungsgrad der Keimpflanzen erklärt die sehr einheitlichen Primärsymptome des Pilzes, die erst nach einer Latenzzeit von mehreren Monaten, zur Blütezeit des Fenchels, auftreten. Die weitere Bekämpfung dieser Krankheit müsste sich auf die Erzeugung von unbefallenem Saatgut, einer Saatgutbehandlung bzw. der Züchtung resistenter Sorten konzentrieren, um den Infektionskreislauf erfolgreich zu unterbrechen.

094 - Taubenrauch, K.¹⁾; Hau, B.²⁾; Kühne, T.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Leibniz Universität Hannover

Ermittlung des Befallsniveaus von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten

Evaluation of the infection levels of *Mycosphaerella anethi* of fennel seeds

In den letzten Jahren hat sich das Befallsniveau von *Mycosphaerella anethi* (anamorph *Passalora punctum*) an Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) zunehmend erhöht. In allen Anbaugebieten ist es in immer kürzeren Zeitabständen zu dramatischen Ertragsausfällen gekommen, da durch die Samenübertragbarkeit des Erregers vermutlich immer stärker befallenes Saatgut weitervermehrt wurde.

Die Auslese befallener Chargen durch Sichtbonitur ist äußerst zeitaufwendig, erfordert einiges Fachwissen zur Symptomatik und ist zur Beurteilung von höheren Probenanzahlen nicht praxistauglich. Bisher existiert kein praktikables Verfahren zur Befallseinschätzung von latent mit *M. anethi* infizierten Fenchelfrüchten.

Ziel des Forschungsprojektes sind die Entwicklung und Standardisierung einer praxistauglichen Methode zur Detektion des *M. anethi*-Befalls an Handelsware und Saatgut, die Entwicklung eines einheitlichen Bewertungssystems zur Selektion von befallsarmem bzw. -freiem Saatgut und die Charakterisierung der vorhandenen Hochleistungssorten bezüglich ihrer genetischen Prädisposition für Saatgutbefall mit *M. anethi*. Die Ermittlung des Befallsniveaus würde Handel und Absatz von weniger belastetem Material zum Nutzen der Anbauer und Konsumenten fördern. Außerdem würde die Saatguttestung zur Sicherung des kommerziellen Fenchelanbaus in Deutschland beitragen und die Zukunft einer attraktiven Sonderkultur nachhaltig sichern. Für die Methodenentwicklung ist es notwendig, das Pathosystem *M. anethi*-Fenchel vielschichtig zu untersuchen, wobei Früchte und Pflanzen mit Labor- und Feldboniturmethode analysiert werden sollen.

Erfassung des epidemischen Befallsverlaufs: Neben den im Labor ermittelten Befallswerten wurden zur Absicherung der Ergebnisse vergleichende Feldversuche durchgeführt, um die epidemische Entwicklung der Krankheit zu bonitieren. Zur quantitativen Erfassung des Befallsverlaufs liegt eine Scannerboniturmethode mit symptomspezifizierter Bildauswertung vor, auf deren Grundlage ein vereinfachtes Boniturschema entwickelt wurde. Während der epidemischen Phase des Erregers ab Ende Juli wurden die durch *M. anethi*-Befall abgestorbenen Blätter der Einzelpflanzen wöchentlich erfasst. Das angebaute Sortenspektrum erwies sich als sehr divers. Einige Fenchelherkünfte waren sehr klein- bzw. hochwüchsig, andere wiesen einen besonders starken Verzweigungsgrad und sehr kleine Dolden auf. Die Entwicklungszeit bis zur Blüte war für den epidemischen *M. anethi*-Befallsausbruch von entscheidender Bedeutung. Bei den frühblühenden Sorten 'Berfena' und 'Magnafena' traten mit Blühbeginn Anfang August bereits die ersten Befallssymptome auf. Die Epidemie entwickelte sich sehr rasch, sodass hier eine wöchentliche Befallszunahme bonitiert werden konnte. Diese frühreifenden Hochleistungssorten wiesen den höchsten Doldenbefall und die stärksten Krankheitssymptome auf. Im Unterschied dazu entwickelte sich bei sehr spät blühenden Herkünften kein epidemischer Befall; hier traten nur vereinzelte Konidienlager auf.

Doldenbefallsbonitur: Zur Beurteilung der Anfälligkeit wird häufig eine Befallsbonitur der Dolden durchgeführt. Beim Anbau eines Spektrums sehr unterschiedlicher Sorten zeigte sich, dass der *M. anethi*-Befallsausbruch immer erst bei Blühbeginn einsetzte und die Doldensymptome auch erst in der letzten Abreifephase entstehen.

Bei Genotypen mit sehr später Blütezeit (Oktober) konnte zwar keine epidemische Ausbreitung des Pilzes mit Doldensymptomen beobachtet werden, die Abreife der Primärdolden begann allerdings auch erst im November. Zu dieser Zeit waren bereits erste Fröste aufgetreten, so dass eingeschätzt werden kann, dass sich unter unseren Klimabedingungen mit diesem Material keine Erträge sichern lassen. Eine vergleichende Doldenbefallsbonitur ist daher ohne Berücksichtigung des Abreifestadiums nicht zur Beurteilung der Anfälligkeit unterschiedlicher Fenchelherkünfte geeignet.

Befallsbeurteilung Früchte: Die Infektion von Fenchelfrüchten mit *M. anethi* ist nicht immer äußerlich erkennbar; der Pilzbefall kann auf das innere Fruchtgewebe beschränkt bleiben. Außerdem sind die verschiedenen Doldenordnungen einer Pflanze in unterschiedlichem Maße durch den Pilz infiziert. Damit wird die zuverlässige visuelle Bewertung des Fruchtbefalls praktisch unmöglich. Diese Situation soll durch die Entwicklung und Anpassung serologischer (PTA-ELISA) und molekularbiologischer Methoden (qPCR) zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *M. anethi* verbessert werden.

095 - Djulic, A.¹⁾; Lenz, H.; Sharma, P.; Bänninger, R.¹⁾; Wirsal, S.G.R.²⁾; Mendgen, K.³⁾, Vögele, R.³⁾

¹⁾ Universität Konstanz; ²⁾ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; ³⁾ Universität Hohenheim

Transformation of the obligate biotrophic rust fungus *Uromyces fabae*

Transformation of the obligate biotrophic rust fungus *Uromyces fabae*

Obligate biotrophic fungi such as rust and powdery mildew are important plant pathogens causing enormous losses of food and forage crops. However, the analysis of the molecular basis of this special host-parasite interaction is faced with a variety of obstacles.

For example, obligate biotrophic fungi cannot be grown in the absence of their respective host plants, and there is currently no system available for a stable transformation of most obligate biotrophic organism. Consequently, many of the modern techniques successfully used on other pathogens cannot be applied to these organisms. Using a dual approach involving Biolistics as well as *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) we have drawn a step closer to the goal of being able to genetically modify rust fungi. We have generated a set of plasmids expressing color and/or selection markers under control of endogenous genetic elements. Promoter and terminator elements from the *U. fabae* gene Uf-PMA1 for which constitutivity of expression has been shown were used to drive expression of the color markers GUS, DsRed, and iGFP. Additionally, we were able to show that the fungicides Benomyl and Carboxin can be successfully used for an *in planta* selection of potential transformants. The genes encoding the targets for Benomyl, β -tubulin (Uf-TBB1), and Carboxin, Succinate Dehydrogenase (Uf-SucDH1) were identified and isolated. Single point mutations responsible for conferring resistance to these fungicides in other organisms were introduced into respective *U. fabae* genes. Using Biolistic bombardment of *U. fabae* spores different parameters like type and size of microcarriers, target distance and helium pressure were varied to optimize gene delivery. Highest transformation frequencies were obtained using urediospores hydrated for 2 hours, 1 μ m gold particles as microcarrier in combination with a helium pressure of 152 bar and a target distance of 6 cm. Similar number of transformants were obtained *in vitro* after bombardment with either GUS, iGFP or DsRed plasmid constructs resulting in about 20 transformants per 4.4×10^5 spores. In addition to expression of the color markers as soluble cytoplasmic protein, we also engineered a DsRed variant targeted to the nucleus. Subcellular localization of the red fluorescence in *U. fabae* nuclei clearly indicates successful transformation of the rust fungus.

Since obligate biotrophs are not able to complete their life cycle without a living host, we established an *in planta* selection procedure using the fungicides Carboxin or Benomyl as selective agent. Potential transformants carrying modified Succinate Dehydrogenase gene (SucDH1(H254Y)) could be carried through 1-2 rounds of selection. Presence of the transgene was verified by PCR. However, further screens did not yield fungicide-resistant urediospores which indicated that transformation so far was likely only transient *in planta*.

ATMT was chosen as a second delivery method using three different *Agrobacterium tumefaciens* strains (AGL-1, GV3103 and LBA1100). Transformation of urediospores by ATMT was more effective since five selection rounds could be achieved after testing different conditions for *Agrobacterium*-spores co-cultivation on the host plant *Vicia faba*. All *A. tumefaciens* strains used yielded similar numbers of urediospores (20 ± 10 , (n =15)) in the first generation when Carboxin selection pressure was applied. Molecular proof of several transformation lines over three to four selection rounds using Nested PCR indicates integration of transgenes into the *U. fabae* genome. Final molecular proof for a stable integration of delivered genes using Southern Blot analysis was not possible so far since DNA amounts obtained from transformed urediospores were not sufficient. We are currently in the process of refining of procedure to lower the detection limit. We now have the tools at hand for a visualisation of transformants *in vitro* and for the successful selection of transformants *in planta*.

096 - Heitmann, B.; Neubauer, C.

Fachhochschule Osnabrück

Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener Pilze an Himbeerruten

Pathogenicity of fungi on canes of red raspberry

Parasitäre Rutenschäden, meist hervorgerufen durch pilzliche Schaderreger, haben im norddeutschen Himbeeranbau enorme Ertragsverluste zur Folge. Sie äußern sich in einem schlechten Austrieb der Tragruten und einem Welken und Absterben der Ruten. Bekämpfungsmaßnahmen erfolgen in der Praxis meist ungezielt und bleiben wirkungslos. In den letzten Jahren haben diese Schäden zugenommen, so dass die Wirtschaftlichkeit des Anbaus in vielen Anlagen in Frage gestellt werden muss. Die Schäden sind auf einen Schaderregerkomplex („midge blight“) zurückzuführen, an dem verschiedene Pilze und die Larven der Himbeerrutengallmücke beteiligt

sind. Letztere zerstören durch ihre enzymatische Aktivität das mehrschichtige Periderm der Rute, welches für Pilze eine unüberwindbare Barriere darstellt. Dadurch entstehen Eintrittspforten, die von den im Rindenparenchym angesiedelten Pilzen genutzt werden, um in das Xylem vorzudringen.

Im Rahmen eines mehrjährigen Forschungsprojektes wurden in 75 Himbeeranlagen erkrankte Ruten gesammelt und mykologisch untersucht. Hierbei wurden zahlreiche pilzliche Erreger aus der Rinde und dem Xylem der Ruten isoliert, deren Bedeutung am Zustandekommen des Schadbildes aber zum Teil unklar ist. Deshalb wurde eine repräsentative Auswahl von Isolatn unterschiedlicher Herkunft in Infektionsversuchen unter praxisnahen Bedingungen hinsichtlich ihrer Pathogenität bzw. Aggressivität an der Hauptsorte 'Tulameen' geprüft. Die Pathogenität der Isolate wurde in Abhängigkeit des Fehlens oder Vorhandenseins eines Periderms bzw. von künstlichen Rinden- und Periderm-verletzungen untersucht. Die zu prüfenden Isolate wurden als Myzelscheiben (Ø 0,5 cm) im unteren Rutenbereich (30-40 cm Rutenhöhe) und unterhalb der Triebspitze (ca. 150 cm Rutenhöhe) auf die Jungtuten gelegt und mit feuchter Watte sowie Parafilm umwickelt. Acht Wochen nach Inokulation wurden an jeder Inokulationsstelle jeweils 25 cm lange Rutenstücke herausgeschnitten und im Labor auf Befall hin ausgewertet. Dies umfasste eine Bonitur der Verbräunung des äußeren Rinden- und Xylemgewebes.

Die meisten Pilze besiedelten das äußere Rindengewebe schneller, wenn es zuvor verletzt worden war. Ohne Verletzung waren die entwickelten Rindenläsionen deutlich kleiner. *Botrytis cinerea* konnte die Rinde am schnellsten besiedeln. Die Läsionen waren bei Versuchsende mit über 80 cm² um ein vielfaches größer als die der anderen Erreger. Unter ihnen verursachte *Leptosphaeria* die größten Befallsstellen. *Fusarium avenaceum*, *Fusarium torulosum* und *Colletotrichum* verursachten signifikant kleinere Läsionen. Andere, wie *F. merismoides*, *Didymella*, *Alternaria* und *Cladosporium*, waren nur schwach aggressiv. Lediglich ausgehend von einer Verletzung waren sie in der Lage die Rinde geringfügig zu besiedeln. Die Bonituren des Xylems zeigen deutlich, dass ein vorhandenes Periderm von den Erregern nicht so schnell durchdrungen werden kann. *Leptosphaeria* breitete sich innerhalb des Versuchszeitraumes am schnellsten über Verletzungen des Periderms im Xylem aus und verursachte die größten Läsionen. Die signifikant kleineren Befallsstellen der übrigen Erreger, welche auf den Bereich der Verletzung begrenzt waren, zeigen, dass sich diese Pathogene - im Gegensatz zu *Leptosphaeria* - nur lokal im Xylem auszubreiten vermögen. Eine Besiedelung des Xylems erfolgte bei vielen Pilzen auch, wenn kein Periderm vorhanden war, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Ein intaktes Periderm verhinderte weitgehend den Befall des Xylems. Kleinste Spuren von Läsionen, wie sie z. B. bei *Leptosphaeria* festgestellt werden konnten, deuten allerdings darauf hin, dass zumindest dieser Erreger über einen längeren Zeitraum hinweg das Abschlussgewebe zu überwinden vermag. Aufgrund der unterschiedlichen Intensität der Besiedelung der Rinde und des Xylems konnten die geprüften Erreger hinsichtlich ihrer Pathogenität bzw. Aggressivität in drei Gruppen unterteilt werden. Damit ist eine Bewertung der am Schadkomplex beteiligten Pilze möglich, welche Ansätze für gezielte Bekämpfungsmaßnahmen liefert.

Virologie / Bakteriologie / Mykologie

097 - Lesker, T.; Göing, J.; Rose, H.; Schneider, C.; Korte, J.; Maiss, E.
Leibniz Universität Hannover

DsRNA Screening – Isolation, molekulare Charakterisierung und phylogenetische Analyse der dsRNA möglicher Viren aus Gemüse-, Kräuter- und Zierpflanzen

DsRNA Screening – Isolation, molecular characterisation and phylogenetic analysis of dsRNA of putative viruses from vegetables, herbs and ornamentals

Die Untersuchung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) aus Pflanzen ist ein unspezifischer Test für mögliche Virusinfektionen, ohne weitere Information von Symptomen oder Sequenzen zu benötigen. Dabei ist es möglich Viren mit dsRNA als Genom oder ssRNA-Viren aufgrund ihrer replikativen Übergangsformen zu isolieren. Des Weiteren lassen sich mögliche subgenomische RNAs aufzeigen. Charakteristische dsRNA Bandenmuster (Anzahl, Größe und Konzentration) geben dabei eine erste Aufklärung über den gefundenen Virus. Weiterhin ist dsRNA neben einer Virusreinigung ein geeignetes Ausgangsmaterial zur Erstellung von Vollhängenklonen und ermöglicht eine exakte Endbestimmung.

Die eingesetzte modifizierte Isolationsmethode nach Dodds (1979) beruht auf einer spezifischen Bindung von dsRNA an Cellulose in Ethanol (15 %) und der Stabilität gegenüber DNasen und RNasen in Hochsalz-Puffern. Für die Aufreinigung wurden rund 10 g Blattmaterial, ein Phenol/Chloroform Extraktionspuffer und zwei mit Cellulose beladene Säulen verwendet. Die Doppelstrangnatur der RNA Präparation wurde durch einen RNase/DNase-Verdau und Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Einzelne dsRNA Banden wurden aus dem Gel eruiert und durch