

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, Triebstucht 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