

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.¹⁾; Spieß, H.²⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ 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