

kalkulierbare dauerhafte Infektionsquelle für latente Erkrankungen sein kann und damit für Baumschulbetriebe und Gartencenter, die Feuerbrandwirtspflanzen kultivieren oder damit handeln, gefährlich ist. Verbesserte Nachweismethoden wie ImmunfluoreszenzTest und PCR bieten gegenüber den herkömmlichen Diagnosemöglichkeiten eine bessere Voraussetzung für Kontrollen auf Freiheit von Infektionen mit dem Feuerbrand an gefährdeten Wirtspflanzen.

093 – Kellerer, T.

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Entwicklung einer Nachweismethode mittels ELISA und PCR-Methoden für samenbürtige Krankheitserreger, insbesondere Weizensteinbrand (*Tilletia caries*) und Gerstenflugbrand (*Ustilago nuda*), bei Ökosaatgut

Development of a Detection System by ELISA and PCR Methods for Seed – Borne Diseases especially Smut Bunt (*Tilletia caries*) and Loose Smut of Barley (*Ustilago nuda*) in Organic Seeds

Ein schneller und sensitiver Nachweis von *Tilletia*-Arten hilft die Qualität von ökologisch erzeugtem Saatgut zu verbessern und Quarantäneregulierungen zu erleichtern. Das Hauptziel des Forschungsprojektes ist die Entwicklung von immunochemischen und PCR-Methoden, um Pilze identifizieren und unterscheiden zu können, welche Brandkrankheiten verursachen. Erste Ergebnisse haben gezeigt, dass es möglich ist *Tilletia caries* auf frisch geerntetem Saatgut in weniger als 5h mittels Western Blot und in weniger als 3h mittels PCR nachzuweisen. Die Basis für die Entwicklung der PCR Primer waren DNA Datenbanksequenzen (www.ncbi.nih.gov) von HSP60, einem Faltungshelferprotein das ubiquitär in allen Pilzen vorkommt. Da noch keine HSP60-Sequenz für *T. caries* in den Datenbanken veröffentlicht ist, musste die Sequenz bestimmt werden. Dies wurde unter Verwendung einer PCR mit *T. controversa* HSP60-Primern erreicht, die unter wenig stringenten Bedingungen und *T. caries* DNA als Matrize durchgeführt wurde. Die DNA Sequenz des PCR Produktes wurde sequenziert und zwei Primer, die den Randbereichen des Fragments entsprechen, wurden synthetisiert. Unter Einsatz dieses spezifischen Primerpaars zeigen sich in einer PCR keine signifikanten Kreuzreaktionen mit *T. controversa* DNA oder der DNA von anderen samenbürtigen Pilzen wie Fusarien. Als Immunogen zur Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen *T. caries* diente Sporensuspension. Im Western Blot zeigt sich unter Verwendung dieses polyklonalen Antiserums eine einzelne spezifische Bande, wenn ein Gesamtproteinextrakt aus Sporen als Probe eingesetzt wird. Hier haben sich ebenfalls wie in der PCR keine Wechselwirkungen mit dem Gesamtproteinextrakt aus *T. controversa* gezeigt. Weitere Nachweismethoden für *T. controversa* und *T. indica* mittels PCR, ELISA und Western Blot werden derzeit entwickelt.

094 – Meyer, N.¹⁾; Karlovsky, P.²⁾; Lind, V.¹⁾

¹⁾ Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Resistenzressourcen

²⁾ Georg-August-Universität Göttingen, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung

Entwicklung einer Real-Time-PCR basierten Quantifizierung des Befalls von *Oculimacula yallundae* und *Oculimacula aciformis* an *Triticum aestivum*

Development of Real-Time PCR based quantification of *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis* in plant material of *Triticum aestivum*

Aufgrund enger Fruchtfolgen gewinnt der parasitäre Halmbbruch, welcher durch den Erreger *Oculimacula yallundae* (syn. *Tapesia yallundae*, anamorph: *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *herpotrichoides*) und *O. aciformis* (syn. *T. aciformis*, anamorph: *P. herpotrichoides* var. *aciformis*) hervorgerufen wird (Crous et al., 2003), weiterhin an Bedeutung. Resistenzzüchtung ist eine mögliche Strategie zur Bekämpfung dieser Krankheit.

Da der Erreger durch die Blattscheiden bis in die Halmbasis vordringt, kann der Gehalt an Pilz-DNA in der Pflanze als Indiz für die Resistenz angesehen werden. Durch die Quantifizierung des DNA-Anteils des Pathogens in Pflanzenproben ist die Möglichkeit gegeben die Resistenz des Weizens zu ermitteln. Eine schnelle und sichere Quantifizierung des DNA-Gehaltes in Resistenztests ist mit der Real-Time PCR möglich (Walsh et al., 2005). Zugleich ist das Verfahren durch die Detektion der Menge der spezifischen DNA-Fragmente mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green relativ preisgünstig.

Während des laufenden Projektes konnten die Voraussetzungen für die Quantifizierung beider Pathogene mittels Real-time PCR geschaffen werden:

Es wurden für jedes Pathogen spezifische Primerpaare entwickelt, die auf eine ITS-Region (internal transcribed spacers) bei *O. yallundae* und *O. aciformis* zurückgehen, welche bei Poupard et al. (1993) veröffentlicht wurde. Die Stabilität, Sensitivität und Spezifität des Assays wurde überprüft. Sowohl für *O. yallundae* als auch für *O. aciformis* kann eine Nachweisgrenze bei 10^{-13} g pilzlicher DNA festgelegt werden. Es bestehen bis zu dieser Nachweisgrenze keine Kreuzreaktionen mit anderen wichtigen Erregern von Pilzkrankheiten im Weizen wie z.B. *Rhizoctonia cerealis*, *Microdochium nivale* var. *nivale*, *Drechslera sorokiniana* und *Fusarium graminearum*.

Die eindeutige Bonitur der Befallsstärke von Pflanzen, die mit dieser PCR-basierten Methode erreicht wird, stellt die Voraussetzung für die angestrebte Entwicklung molekularer Marker für verschiedene Resistenzgene gegen die Halmbruchkrankheit dar.

Literatur

Crous PW, Groenewald JZ, Gams W (2003) Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *Phytopathology* 85: 918–927

Poupard P, Simonet P, Cavelier N, Bardin R (1993) Molecular characterisation of *Pseudocercospora herpotrichoides* isolates by amplification of ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Plant Pathology* 42: 873–881

Walsh K, Korimbocus J, Boonham N, Jennings P, Hims M (2005) Using Real-time PCR to Discriminate and Quantify the Closely Related Wheat Pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis*. *Journal of Phytopathology* 153: 715–721

095 – Eisold, A.-M.; Schadock, I.; Barga, S. von; Goßmann, M.; Büttner, C.

Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

Nachweis von Fumonisin-Biosynthese-Genen in *Fusarium* spp.-Isolaten verschiedener Wirtspflanzenherkünfte

Detection of fumonisin-genes in isolates of various *Fusarium* spp. originating from different host plants

Die Gattung *Fusarium* umfasst Arten, die sowohl wirtschaftlich bedeutsame Krankheitserreger an Kulturpflanzen sind, zudem aber auch noch als potentielle Mycotoxinbildner, v.a. des als kanzerogen eingestuften Toxins Fumonisin B₁, gelten. Als pathogenrelevante *Fusarium*-Arten wurden in vorliegenden Untersuchungen *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens* und *F. subglutinans* verwendet. Die Isolate stammen aus vorangegangenen pilzparasitären Wirtspflanzen-untersuchungen und wurden aus ober- und unterirdischen Pflanzenteilen von Spargel, Mais, Raps, Rübe, Kartoffel, Miscanthus, Erbse, Lupine und Sorghum isoliert. Für die molekularen Untersuchungen wurden die Pilzisolat aus Erdkulturen der Stammsammlung des Fachgebietes auf künstlichem Nährsubstrat reaktiviert. Nach DNA-Isolierung aus Reinkulturen wurden Isolate oben angegebener *Fusarium* spp. mit Hilfe der PCR auf die Nachweisbarkeit der *fum1*- und *fum8*-Gene untersucht. Die Gene kodieren für zwei initiale Enzyme der Fumonisin-Biosynthese, der Polyketid-Synthase und einer Aminoacyl-transferase. *Fum*-Gen-spezifische Amplifikate wurden nachfolgend mit geeigneten Restriktionsenzymen einer RFLP-Analyse unterzogen.

In dreizehn *F. proliferatum*-Isolaten aus Spargel und zwei Pilzproben aus Mais war sowohl *fum1* als auch *fum8* nachweisbar. Ebenso konnten beide Gene in je einem Isolat von *F. redolens* aus Erbse, *F. subglutinans* aus Miscanthus bzw. *F. verticillioides* aus Mais amplifiziert werden. Außerdem war entweder das Polyketid-Synthase- oder das Aminoacyl-Transferase-Gen in *F. oxysporum*-Proben (aus Spargel, Raps Lupine und Miscanthus) sowie in anderen Isolaten der vorher genannten *Fusarium*-Arten, die aus weiteren Wirtspflanzen wie beispielsweise Kartoffel, Rübe und Sorghum stammten, durch die Gen-spezifische PCR zu detektieren. Der Nachweis von *fum1* bzw. *fum8* in den untersuchten *Fusarium*-Species unterstützt die Vermutung, dass diese Isolate zur Fumonisinbildung fähig sind. Die Analyse der *fum1* und *fum8*-Genfragmente von *F. proliferatum*-Isolaten aus unterschiedlichen Wirtspflanzen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, lies jedoch keine wirtspflanzenabhängige Heterogenität der untersuchten Abschnitte der Fumonisin-Biosynthesegene erkennen. Lediglich ein *F. proliferatum*-Isolat aus Mais zeigte ein verändertes Restriktionsmuster des *fum1*-Fragmentes durch eine fehlende RsaI-Schnittstelle im Exon2.

Ziel weiterführender Untersuchungen ist der in vivo Nachweis der *fum1* – und *fum8* –Gene an erkrankten Kulturpflanzen.