

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für Pflanzenschutz im Forst<sup>1</sup>),  
Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie u. biologische Sicherheit<sup>2</sup>), Braunschweig

## ***Mycosphaerella*-Nadelpilze der Kiefer – Identifikation durch ITS-RFLP-Muster**

***Mycosphaerella* needle fungi – Identification by means of ITS-RFLP patterns**

Leo Pehl<sup>1</sup>), Wolfgang Burgermeister<sup>2</sup>) und Alfred Wulf<sup>1</sup>)

### **Zusammenfassung**

Die Kiefernadelpilze *Mycosphaerella pini* und *M. dearnessii* zählen weltweit zu den gefährlichsten Parasiten der Baumgattung Kiefer und sind in der EU als Quarantäneschadorganismen eingestuft. Eine sichere und schnelle Diagnose ist die Grundvoraussetzung zur Anwendung geltender Quarantänevorschriften, um die weitere Ausbreitung dieser Erreger zu verhindern. Die Identifizierung der beiden Schadpilze ist mit herkömmlichen, makro- und mikroskopischen Methoden schwierig und zeitintensiv. Daher wurde ein molekulares Verfahren (ITS-RFLP-Analyse) entwickelt, mit dem die *Mycosphaerella*-Arten anhand der Restriktionsfragmentmuster der amplifizierten ITS-Bereiche ihrer ribosomalen DNA identifiziert werden können. Als Ausgangsmaterial wurde zunächst lyophilisiertes Pilzmyzel aus Flüssigkulturen der Pilze verwendet. Die daraus extrahierte DNA wurde mit rDNA-spezifischen Primern amplifiziert und mit fünf Restriktionsenzymen gespalten. Die nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente erhaltenen ITS-RFLP-Muster waren speziesspezifisch und ermöglichten eine Identifizierung der beiden *Mycosphaerella*-Arten und ihre differentialdiagnostische Abgrenzung von 10 weiteren auf Kiefernadeln vorkommenden Pilzarten. Verschiedene Stämme jeweils einer *Mycosphaerella*-Art zeigten das gleiche ITS-RFLP-Muster, wodurch die Arterkennung erleichtert wird. Zur direkten Untersuchung infizierter Nadelsegmente wurde ein DNA-Mikroextraktionsverfahren entwickelt, das ausreichend DNA für die ITS-RFLP-Analyse liefert. Damit ist die molekulare Identifizierung der beiden Quarantäneschadpilze in zwei Tagen durchführbar.

**Stichwörter:** *Mycosphaerella dearnessii*, *Lecanosticta acicola*, *Mycosphaerella pini*, *Dothistroma septospora*, Diagnose, PCR, ITS-RFLP

### **Abstract**

The pine needle fungi *Mycosphaerella pini* and *M. dearnessii* are among the most dangerous parasites of pines worldwide and are classified as quarantine pests in the EU. A safe and fast diagnostic procedure is precondition for application of quarantine control, in order to prevent further spread of these pests. Identification of the two parasitic fungi by means of conventional macro- and microscopic methods is difficult and time-consuming. Therefore, a molecular technique (ITS-RFLP analysis) was developed which permits identification of the *Mycosphaerella* species by means of restriction fragment patterns of their amplified

ITS sections of ribosomal DNA. Lyophilized fungal mycelium from liquid culture of the fungi was used as starting material. DNA extracted from this material was amplified using rDNA-specific primers and digested using five restriction enzymes. ITS-RFLP patterns obtained after electrophoretic separation of DNA fragments were species-specific and permitted identification of the two *Mycosphaerella* species and their differential diagnostic distinction from 10 other fungus species also occurring on pine needles. Different strains within each *Mycosphaerella* species gave identical ITS-RFLP patterns, which facilitates species identification. For direct examination of infected needle segments, a DNA micro extraction procedure was developed that provides sufficient DNA for ITS-RFLP analysis. In this way, molecular identification of the two quarantine pest fungi can be carried out in two days.

**Key words:** *Mycosphaerella dearnessii*, *Lecanosticta acicola*, *Mycosphaerella pini*, *Dothistroma septospora*, diagnosis, PCR, ITS-RFLP

### **Einleitung**

Die zu den Ascomyceten gestellten Nadelpilze *Mycosphaerella pini* (Anamorph: *Dothistroma septospora*) und *Mycosphaerella dearnessii* (Anamorph: *Lecanosticta acicola*) zählen weltweit zu den gefährlichsten Parasiten an der Baumgattung Kiefer (CABI/EPPO, 1998; EVANS, 1984; PETERSON und GRAHAM, 1974). Das Vorkommen dieser in Europa als Quarantäneschadorganismen eingestuft Pilze (Richtlinie RL 2000/29 EG) nimmt seit einigen Jahren stetig zu und belegt, dass beide Pilzarten bereits in einigen Regionen latent vorhanden sind. Als jüngstes Beispiel sei hier der Nachweis von *M. dearnessii* an *Pinus mugo* in Italien (LA PORTA und CAPRETTI, 2000) genannt, nachdem der Nadelparasit zuvor in Österreich (BRANDSTETTER und CECH, 1999), der Schweiz (HOLDENRIEDER und SIEBER, 1995), Deutschland (PEHL, 1995) und Frankreich (CHANDELIER et al., 1994) festgestellt wurde. *Mycosphaerella pini* wurde in Mitteleuropa bereits 1954 in England (MURRAY und BATKO, 1962) und 1983 in der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesen (BUTIN und RICHTER, 1983). Heute ist der Befall von Kiefern durch *M. pini* schon in 17 europäischen Ländern bekannt. In Deutschland wird das Vorkommen der Nadelparasiten bisher nur aus den süddeutschen Ländern gemeldet, jedoch mit steigender Frequenz (MASCHNING und PEHL, 1994; BLASCHKE, 2000, 2001). Gemäß dem Wirtsspektrum beider Pilzarten (GILMOUR, 1967; PETERSON, 1967; GIBSON, 1979; EVANS, 1984) muss man praktisch alle in

Deutschland angebauten Kiefernarten als anfällig einstufen, wobei *Pinus mugo* und *Pinus nigra* besonders stark befallen werden (PEHL und BUTIN, 1992; BLASCHKE, 2001). Die Gefahr einer Verbreitung der in der englischsprachigen Literatur auch als „red band disease“ (*M. pini*) und „brown spot disease“ (*M. dearnessii*) bezeichneten Nadelkrankheiten wird hauptsächlich in der Verbringung von infizierten Pflanzen und im Handel von Kiefern Saatgut gesehen, das mit infizierten Nadelresten kontaminiert ist (CABI/EPPO, 1997; PEHL, 1995; CHANDELIER et al., 1994).

Eine Grundvoraussetzung zur Anwendung der geltenden Quarantänevorschriften ist die sichere Diagnose der Erreger. Dies erfordert im Fall der beiden morphologisch und in ihrer Symptomatik sehr ähnlichen Nadelparasiten umfangreiche differentialdiagnostische Kenntnisse (PEHL und WULF, 2001), zumal die Baumgattung Kiefer die größte Anzahl pilzlicher und tierischer Schädlinge aller Nadelbaumgattungen aufweist (HANISCH und KILTZ, 1990). Zur zweifelsfreien Bestimmung beider Nadelpilze mit herkömmlichen Methoden ist der Nachweis der Konidiosporen notwendig. Diese werden jedoch nur bei feuchter Witterung und von vollständig ausgereiften Fruchtkörpern gebildet. Alle anderen Stadien der Krankheitsentwicklung lassen sich sonst nur durch eine aufwendige und langwierige Isolierung des Erregers auf ein künstliches Nährmedium und anschließende Wachstumsphase bis zur Sporenbildung identifizieren.

Molekularbiologische Techniken werden heute immer häufiger zur Charakterisierung, Identifizierung und Klassifizierung von Pilzen eingesetzt (MANICOM et al., 1990; BACHMANN, 1994; ANNAMALAI et al., 1995; FISCHER und WAGNER, 1999). Zur Klärung taxonomischer und phylogenetischer Fragestellungen eignet sich die Analyse der ribosomalen DNA (rDNA) (HILLIS und DIXON, 1991). Mit Hilfe von Primern, die an konservierte Bereiche der ribosomalen Gene binden, kann der Bereich der „intergenic transcribed spacer“-Regionen (ITS-1 und ITS-2) durch PCR amplifiziert werden (WHITE et al., 1990). Bei vielen Organismen zeigen die ITS-Regionen Sequenzpolymorphismen auf der Artebene. Durch Restriktionsspaltungen der amplifizierten DNA erhält man daher für jede Art charakteristische Restriktionsfragment-Muster. Dieses als ITS-RFLP-Analyse bezeichnete Verfahren wurde z.B. zur Artunterscheidung bei *Trichoderma* (MEYER, 1991), *Pythium* (CHEN et al., 1992), *Fusarium* (HERING, 1997) und *Armillaria* (SCHULZE et al., 1997) sowie den Nematodengattungen *Meloidogyne* (SCHMITZ et al., 1998) und *Bursaphelenchus* (HOYER et al., 1998) mit Erfolg angewandt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine sichere und schnelle Identifizierung und Differentialdiagnose der *Mycosphaerella*-Nadelpilze durch molekularbiologische Verfahren zu ermöglichen.

## Material und Methoden

Neben den in Deutschland vorkommenden Pilzstämmen von *Mycosphaerella pini* und *M. dearnessii* wurden verschiedene europäische, nord- und südamerikanische Pilzisolat dieser Nadelparasiten in die Untersuchungen einbezogen (Tab. 1). Untersucht wurden dabei die aus phytopathologischer Sicht wichtigeren Nebenfruchtformen der Nadelparasiten: *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola*. Da Kiefernadeln von einer Vielzahl verschiedener Pilze besiedelt werden können, war es zudem notwendig, auch die häufigsten in der Bundesrepublik vorkommenden Pilzarten auf Kiefernadeln (Tab. 2) differentialdiagnostisch zu untersuchen.

Zur Gewinnung von Pilzmyzel für die DNA-Extraktion der in Tabelle 1 und 2 gelisteten Pilzarten wurde ein 2%iges Malzextrakt-Flüssigmedium angesetzt. In Abhängigkeit vom Myzelwachstum ergab sich eine 3–6-wöchige Kulturdauer. Nach Reinigung des gewonnenen Myzels vom Kulturmedium mit sterilem

**Tab. 1. Untersuchte Pilzstämmen in- und ausländischer Isolate von *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola***

Pilzart/ Stamm-Nr.	Ursubstrat	Fundort	Jahr
<i>Dothistroma septospora</i>			
D 291	<i>Pinus mugo</i>	Eibsee, Bayern	1999
D 290	<i>Pinus mugo</i>	Mayerhofen, Österreich	1999
D 283	<i>Pinus nigra</i>	Olaszfalu, Ungarn	1999
D 279	<i>Pinus mugo</i>	Karwendelgebirge, Bayern	1996
D 275	<i>Pinus sylvestris</i>	Pertisau, Grundache, Österreich	1996
D 274	<i>Pinus sylvestris</i>	Modry Kamen, Slovenien	1996
D 272	<i>Pinus mugo</i>	Pertisau, Österreich	1993
D 269	<i>Pinus radiata</i>	Valdivia, Chile	1990
D 268	<i>Pinus strobus</i>	Oberstdorf, Bayern	1990
D 267	<i>Pinus nigra</i>	Krakow, Polen	1990
<i>Lecanosticta acicola</i>			
M 270	<i>Pinus palustris</i>	Louisiana, USA	–
M 269	<i>Pinus radiata</i>	Pyrénées-Atlantiques, Frankreich	1998
M 268	<i>Pinus attenuata</i> × <i>radiata</i>	Gironde, Frankreich	1993
M 267	<i>Pinus mugo</i>	Weesen, Schweiz	1999
M 266	<i>Pinus mugo</i>	Zollikon, Schweiz	1999
M 260	<i>Pinus halepensis</i>	Bosque Escuela, N. L. Mexico	1998
M 253	<i>Pinus mugo</i>	Murnau, Bayern	1994

Wasser erfolgte die Lyophilisierung des Myzels (Gefriertrocknungsanlage Christ Delta I). Zur DNA-Extraktion wurden jeweils 20–30 mg lyophilisiertes Myzel in einem sterilen Mörser mit flüssigem Stickstoff und Quarzsand zu einem feinen Pulver zermahlen. Die anschließende Extraktion der DNA erfolgte nach der von DELLAPORTA et al. (1983) beschriebenen Methode. Eine fluorimetrische Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 mit dem DNA-Fluorimeter DyNA Quant 200 (Hofer). Die PCR wurde in 50 µl Reaktionsvolumina mit einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler durchgeführt. Ein Ansatz enthielt jeweils 3 U Taq DNA-Polymerase (Stratagene), 5 µl 10× Reaktionspuffer (Stratagene), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTP's (Boeringer Mannheim), 0,6 µM forward primer ITS5, 5'-GGAAGTAAAAGT-CGTAACAAGG-3' und 0,6 µM reverse primer ITS4, 5'-TCCT-CCGCTTATTGATATGC-3' nach WHITE et al. (1990) sowie 2 ng DNA. Das PCR-Programm umfasste eine Initialdenaturierung bei 94 °C für 2,5 min, 35 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min annealing bei 55 °C und 2 min Extension bei 72 °C. Zur Vervollständigung partieller DNA-Stränge erfolgte nach dem letzten Zyklus eine Extension von 5 min bei 70 °C. Jeweils 5 µl jeder Probe wurde anschließend zur Abschätzung der notwendigen Menge an ITS-Fragment für die nachfolgende Restriktionsanalyse in einem 2%igen Agarose-Gel bei 40 V für

**Tab. 2. Zur Differentialdiagnose zusätzlich untersuchte Kiefernadelnpilze**

Pilzart	Stamm-Nr.	Ökologie
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	B 208	Parasit
<i>Cyclaneusma minus</i> (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter	C 348	Parasit
<i>Lophodermium conigenum</i> (Brunaud) Hilittz.	L 242	Saprophyt
<i>Lophodermium pinastri</i> (Schrad.) Chév.	L 230	Saprophyt
<i>Lophodermium seditiosum</i> Minter, Staley & Millar	L 225	Parasit
<i>Phacidium infestans</i> Karst.	P 431	Parasit
<i>Rhizosphaera pini</i> (Corda) Maublanc	R 211	Parasit
<i>Sclerophoma pithyophila</i> (Corda) Höhn.	S 234	Saprophyt
<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Desm.) Dyko & Sutton	S 293	Parasit
<i>Strasseria geniculata</i> (Berk & Br.) Höhn.	S 281	Parasit

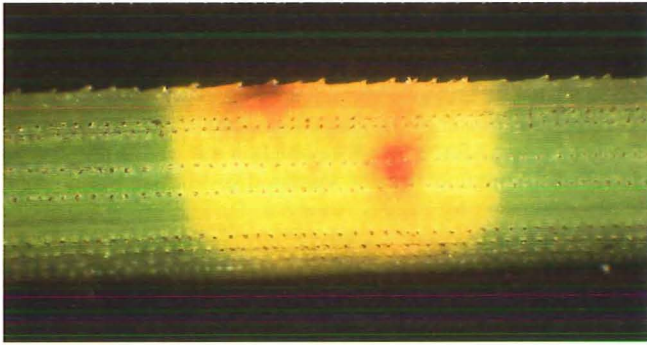


Abb. 1. Gelbe Läsionen als erstes Anzeichen einer Pilzinfektion durch *Dothistroma septospora*.

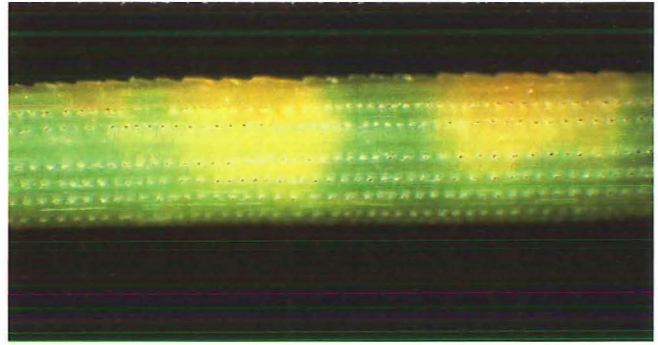


Abb. 2. Gelbe Läsionen als erstes Anzeichen einer Pilzinfektion durch *Lecanosticta acicola*.

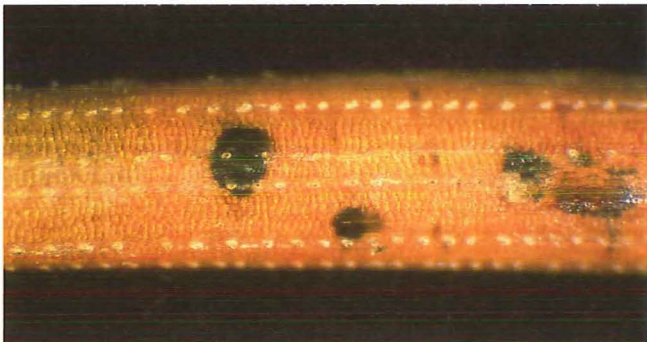


Abb. 3. Stromaentwicklung unterhalb der Nadelepidermis (*Dothistroma septospora*).



Abb. 4. Stromaentwicklung unterhalb der Nadelepidermis (*Lecanosticta acicola*).



Abb. 5. Fruchtkörper von *Dothistroma septospora* durchbrechen die Nadelepidermis.

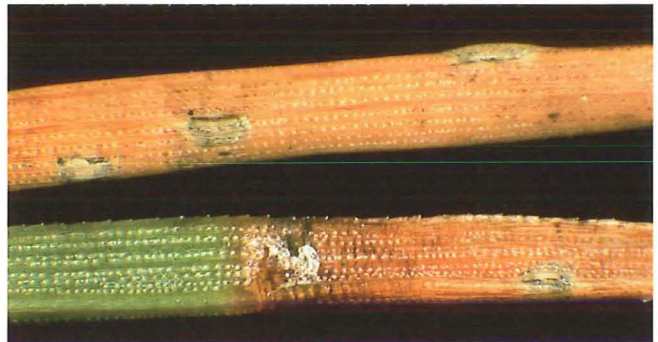


Abb. 6. Fruchtkörper von *Lecanosticta acicola* durchbrechen die Nadelepidermis.

**Abb. 1–6. Verschiedene Symptomausbildungen bzw. Krankheitsentwicklungsstufen an Kiefernadeln (*Pinus mugo*) nach einer Infektion durch *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola*.**

3 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt und die amplifizierte rDNA mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die amplifizierte rDNA wurde mit 5 Restriktionsendonukleasen (Hinf I, Hae III, Hha I, Nci I, Hpa II) fragmentiert. Dazu wurden jeweils 5 bis 8 µl der PCR-Produkte mit 5 U des entsprechenden Restriktionsenzym in 10 µl Reaktionsvolumen für 3 h bei 37 °C inkubiert. Zur Größenanalyse der erhaltenen Restriktionsfragmente wurde eine Gelelektrophorese in einem 2,5%igen Agarose-Gel bei 40 V für 3 Stunden durchgeführt und die Fragmente mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt.

Da das o. a. Standardverfahren zwar eine sichere Diagnose, jedoch durch die vorherige Isolierung der Pilze auf einem künstlichen Nährboden nicht das Kriterium einer schnellen Diagnose erfüllt, wurde in einem zweiten Schritt die Methodik diesbezüglich optimiert. Als Ausgangsmaterial der DNA-Extraktion kamen dabei von *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola*

infizierte, 2–4 mm lange Nadelsegmente der Bergkiefer (*Pinus mugo*) mit verschiedenen Symptomausprägungen (Infektionsflecken, Stromaentwicklung unter der Nadelepidermis, unreife Conidiomata; Abb. 1–6) zum Einsatz. Zur Kontrolle wurden gesunde, grüne Nadelsegmente von *Pinus mugo* verwendet. Die Nadelsegmente wurden unter Verwendung steriler Borosilikatglas-Mikromörser (Typ G2, Carl Roth, Karlsruhe) und 30 µl AP-1 Puffer des DNeasy® Plant Mini Kit von Qiagen homogenisiert. Zur Isolierung der DNA wurde das DNA-Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers eingesetzt, wobei die Mengenangaben bis auf den AE-Puffer auf jeweils ¼ der angegebenen Menge reduziert wurden, da das Probengewicht (1 Nadelsegment) nur 2–3 mg betrug. Die DNA wurde mit zweimal 50 µl AE-Puffer eluiert. 5 µl-Aliquote der DNA-Extrakte wurden für die PCR eingesetzt. Anschließend wurden die PCR und ITS-RFLP wie oben beschrieben durchgeführt.

## Ergebnisse und Diskussion

Nach Amplifikation der rDNA der in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Kiefernadelpilze mit den von WHITE et al. (1990) beschriebenen Primern ITS5 und ITS4 wurden DNA-Fragmente erhalten, die im Größenbereich von 580 bis 950 bp lagen (vgl. Tab. 3). Die DNA-Fragmente der beiden Quarantäneschadpilze *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola* hatten mit 580 bp bzw. 600 bp zwar etwas unterschiedliche Größe, konnten aber trotzdem nicht zur direkten Differenzierung genutzt werden, da auch bei anderen Kiefernadelpilzen DNA-Fragmente mit 580 bzw. 600 bp amplifiziert wurden. Deutliche Unterscheidungen gelangen jedoch durch die ITS-RFLP-Analysen, deren Ergebnisse in Abbildung 7 und Tabelle 3 wiedergegeben sind. Durch den kombinierten Einsatz der Restriktionsendonukleasen Hinf I, Hae III, Hha I, Nci I und Hpa II konnten Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen aufgedeckt werden, die eine Differenzierung aller untersuchten Pilzarten ermöglichen. Innerhalb einer Art lieferten alle getesteten Pilzisolat von *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola* (vgl. Tab. 1) identische ITS-RFLP-Muster. Die Isolat-unabhängigen Muster erlauben somit eine sichere Artbestimmung auch bei morphologisch heterogenen Isolaten. Spezifische Fragmentmuster der einzelnen Arten wurden jeweils mit einem oder mehreren der eingesetzten Enzyme erhalten. Fünf

weitere getestete Restriktionsenzyme (Alu I, Msp I, Rsa I, Dde I, Taq I) ergaben nur wenige diagnostisch verwertbare Fragmente und wurden daher nicht einbezogen.

Eine schnelle und sichere Diagnose der Pilze direkt aus infiziertem Nadelmaterial konnte durch den Einsatz des Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit in Kombination mit Mikromörsern bei der DNA-Extraktion erreicht werden. Die Mikroextraktion von bis zu 10 Nadelproben, das Ansetzen der PCR-Proben und die PCR können an einem Tag ausgeführt werden. Eine Kontrollelektrophorese der PCR-Produkte, die Restriktionsspaltungen und abschließende Elektrophorese der Restriktionsfragmente können am zweiten Tag abgearbeitet werden. Damit ist eine Identifizierung der beiden Quarantäneschadpilze in zwei Tagen durchführbar. Die Nachweisgrenze erstreckt sich dabei auf eindeutig einer Pilzinfektion zuzuordnende Symptomausbildungen wie die Stroma- und Nadelbildung unter der Nadel-epidermis (vgl. Abb. 3, 4) oder durch die Nadel-epidermis brechende, noch nicht sporulierende Fruchtkörper (vgl. Abb. 5, 6). Keine reproduzierbaren PCR-Produkte konnten hingegen mit den recht unspezifischen gelben Infektionsflecken (vgl. Abb. 1, 2) erzielt werden. Offenbar konnte aus diesem frühen Infektionsstadium nicht immer genügend Pilz-DNA für eine Amplifikation extrahiert werden. Mit den zur Kontrolle eingesetzten gesunden Nadelsegmenten konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Somit wird die im

**Tab. 3. Restriktionsfragmentgrößen der amplifizierten rDNA von 12 Kiefernadelpilzen unter besonderer Berücksichtigung der Quarantäneschadpilze *Dothistroma septospora* und *Lecanosticta acicola***

Pilzarten / Stamm-Nr.	ITS-PCR-Produkt (bp)	Restriktionsfragmente (bp) mit				
		Hinf I	Hae III	Hha I	Nci I	Hpa II
<i>Botrytis cinerea</i> B 208	580	300	450	310	320	320
		190	130	140	220	220
		100		110		
<i>Cyclaneusma minus</i> C 348	600	320	450	200	290	210
		290		(180)	190	180
<i>Dothistroma septospora</i> D 291	580	290	490	180	410	290
		190	90	(170)	150	150
		120		100		
<i>Lecanosticta acicola</i> M 253	600	290	260	350	410	290
		220	(80)	150		140
		110				
<i>Lophodermium conigenum</i> L 242	750	290	500	180	520	300
		180	150	150	180	170
		140	(90)	100		
<i>Lophodermium pinastri</i> L 230	750	300	350	290	250	250
		(200)	300	(200)	140	140
		(140)		(140)		
<i>Lophodermium seditiosum</i> L 225	750	280	350	190	370	290
		130	200	120	250	230
			150			
<i>Phacidium infestans</i> P 431	950	650	300	320	350	270
		280	200	280	220	220
					190	190
				140	140	
<i>Rhizosphaera pini</i> R 211	610	300	550	300	610	490
		190		210		
		170		170		
<i>Sclerophoma pithyophila</i> S 234	610	300	380	270	610	610
		(190)	180	190		
		(170)		150		
<i>Sphaeropsis sapinea</i> S 293	600	270	450	170	600	500
		220	130			
<i>Strasseria geniculata</i> S 281	600	180	410	340	340	200
		(140)	120	140	110	150
		(100)		(100)		(100)

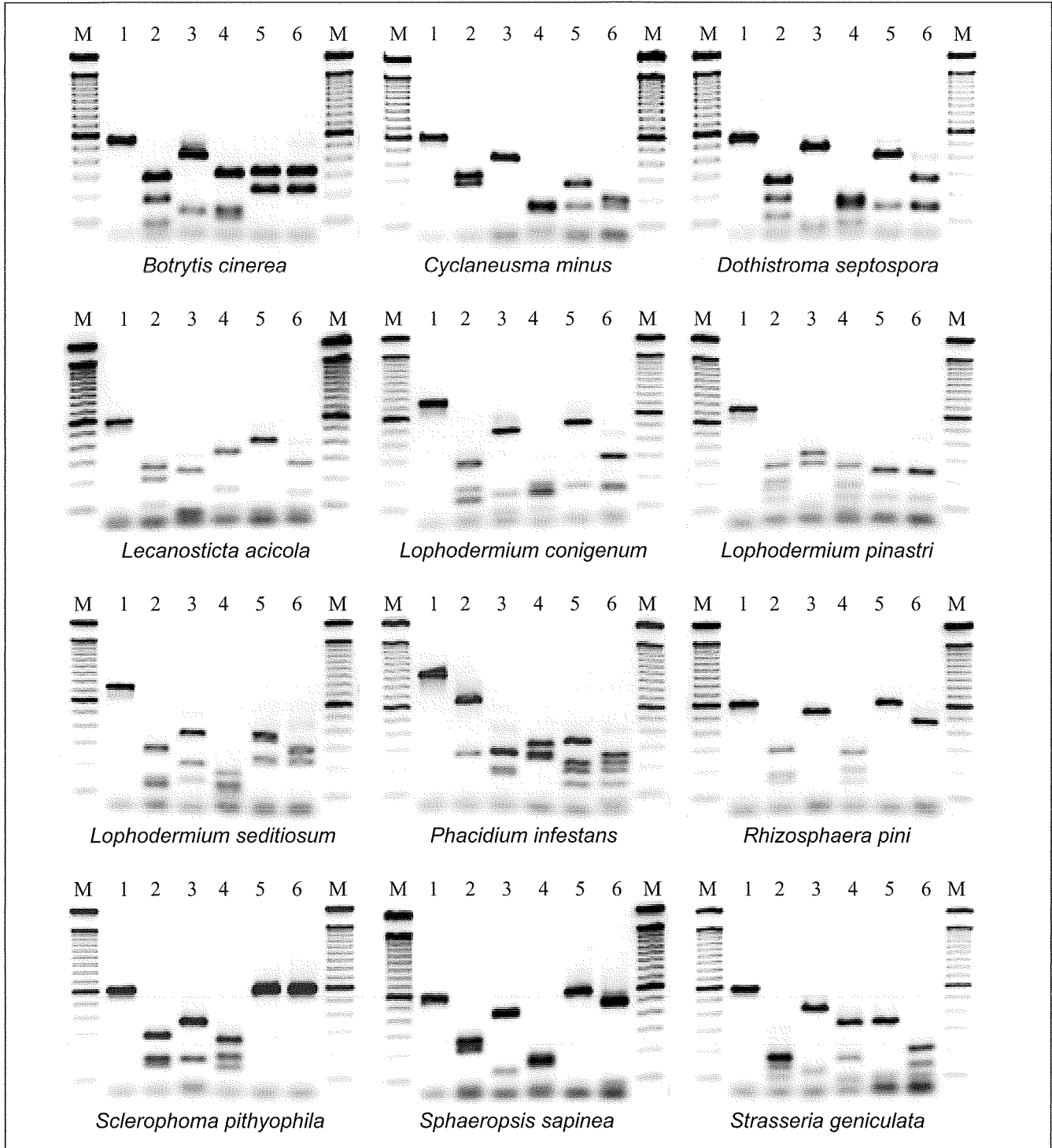


Abb. 7. ITS-RFLP-Fragmentmuster verschiedener Kiefern-Nadelpilze (vgl. Tab. 1, 2, 3). M: DNA-Längenmaßstab (100 bp ladder, Gibco); 1: rDNA-Amplifikat; 2-6: DNA-Fragmente nach Spaltung der amplifizierten rDNA mit Hinf I, Hae III, Hha I, Nci I, bzw. Hpa II.

Extrakt vorhandene Kiefern-DNA mit den eingesetzten Primern nicht amplifiziert und die PCR-Produkte können eindeutig auf das Vorhandensein der Nadelpilze zurückgeführt werden.

**Danksagung**

Für die technische Assistenz bei den molekularbiologischen Arbeiten danken wir Frau DAGMAR TRAUTMANN.

**Literatur**

ANNAMALAI, P., H. ISHII, D. LALITHAKUMARI, R. REVATHI, 1995: Polymerase chain reaction and its application in fungal disease diagnosis. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **102** (1), 91-104.  
 BACHMANN, K. 1994: Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.* **126**, 403-418.  
 BLASCHKE, M., 2000: Erstmals autochthone Kiefern in Bayern befallen. *LWF aktuell* **24**, 18-19.  
 BLASCHKE, M., 2001: Gefährdet Pilzbefall unsere Latschen? *Quarantä-*

- neschädlinge an autochthonen Latschen. Jahrbuch des Vereins zum Schutz der Bergwelt **66**, 93–98.
- BRANDSTETTER, M., T. CECH, 1999: Neue Krankheit an Kiefer. Österreichische Forstzeitung **110**, 35–36.
- BUTIN, H., J. RICHTER, 1983: *Dothistroma*-Nadelbräune: Eine neue Kiefernkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **35**, 129–131.
- CABI/EPPO, 1997: Quarantine Pests for Europe. 2. Aufl., Cambridge, University Press, 1425 S.
- CABI/EPPO, 1998: Distribution maps of Quarantine Pests for Europe. CABI Publishing, Wallingford, UK, 326 S.
- CHANDELIER, P., C. LAFAURIE, F. MAUGARD, 1994: Découverte en France de *Mycosphaerella dearnessii* sur *Pinus attenuata x radiata*. C. R. Acad. Agric. Fr. **80**, 103–108.
- CHEN, W., J. W. HOY, R. W. SCHNEIDER, 1992: Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. Exp. Mycol. **16**, 22–34.
- DELLAPORTA, S. L., J. WOOD, J. B. HICKS, 1983: A plant DNA miniprep- aration: version II. Plant Molecular Biology Reporter **1** (4), 19–21.
- EVANS, H. C., 1984: The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs *Cercoseptoria*, *Dothistroma* and *Lecanosticta* on pines. Mycol. Papers **153**, 162 S.
- FISCHER, M., T. WAGNER, 1999: RFLP analysis as a tool for identification of lignicolous basidiomycetes: European polypores. Eur. J. For. Path. **29**, 295–304.
- GIBSON, I. A. S., 1979: Diseases of Forest trees widely planted as exotics in the Tropics and Southern Hemisphere. Part II. The genus *Pinus*. Commonwealth Forestry Institute – Commonwealth Mycological Institute, Oxford-Kew, 71–76.
- GILMOUR, J. W., 1967: Distribution, impact and control of *Dothistroma pini* in New Zealand. Proceedings 14<sup>th</sup> Congress of International Union of Forest Research Organisations Munich **5**, 221–248.
- HANISCH, B., E. KILTZ, 1990: Waldschäden erkennen: Fichte und Kiefer. Stuttgart, Ulmer, 334 S.
- HERING, O., 1997: Charakterisierung und Differenzierung bei *Fusarium* Link mittels RAPD und ITS-RFLP. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. **331**, 133 S.
- HILLIS, D. M., M. T. DIXON, 1991: Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology **66**, 411–453.
- HOLDENRIEDER, O., T. N. SIEBER, 1995: First report of *Mycosphaerella dearnessii* in Switzerland. Eur. J. For. Path. **25**, 293–295.
- HOYER, U., W. BURGERMEISTER, H. BRAASCH, 1998: Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **50**, 273–277.
- LA PORTA, N., P. CAPRETTI, 2000: *Mycosphaerella dearnessii*, a needle- cast pathogen on mountain pine (*Pinus mugo*) in Italy. Plant Disease **84**, 922.
- MANICOM, B. Q., M. BAR-JOSEPH, M. M. BECKER, 1990: Molecular methods of potential use in the identification and taxonomy of filamentous fungi, particularly *Fusarium oxysporum*. Phytophylactica **22** (2), 233–239.
- MASCHNING, E., L. PEHL, 1994: Bedrohung autochthoner Latschen durch *Dothistroma*-Nadelbräune. AFZ Der Wald **49**, 249–252.
- MEYER, R. J., 1991: Molecular systematics of *Trichoderma* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments (Abstr.). Phytopathology **81**, 1240.
- MURRAY, J. S., S. BATKO, 1962: *Dothistroma pini* Hulbary: a new disease on pine in Britain. Forestry **35**, 57–65.
- PEHL, L., 1995: *Lecanosticta*-Nadelbräune – Eine neue Kiefernkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland. Nachrichtenblatt Deut. Pflanzenschutz. **47**, 305–309.
- PEHL, L., H. BUTIN, 1992: *Dothistroma septospora*: Ein neuer Schadpilz an der Bergkiefer. AFZ **47**, 758–760.
- PEHL, L., A. WULF, 2001: *Mycosphaerella*-Nadelpilze der Kiefer. Schadsymptome, Biologie und Differentialdiagnose. Nachrichtenblatt Deut. Pflanzenschutz. **53**, 217–222.
- PETERSON, G. W., 1967: *Dothistroma* needle blight of pines in North America. Proc. 14<sup>th</sup> Congress IUFRO, München, 269–278.
- PETERSON, G. W., D. A. GRAHAM, 1974: *Dothistroma* blight of pines. U.S. Forest Service, Forest Pest Leaflet 143.
- Richtlinie 2000/29/EG vom 08.05.2000. Amtsblatt EG L 169/1 NF. Im Internet unter Informationen der Abteilung Pflanzengesundheit der BBA unter [www.bba.de](http://www.bba.de)
- SCHMITZ, B., W. BURGERMEISTER, H. BRAASCH, 1998: Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz. **50**, 310–317.
- SCHULZE, S., G. BAHNWEG, E. M. MÖLLER, H. SANDERMANN J R., 1997: Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *A. ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. Eur. J. For. Path. **27**, 225–239.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, J. TAYLOR, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, T. J. WHITE (eds.): PCR Protocols. A guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, 315–322.

Zur Veröffentlichung angenommen: Juli 2004

Kontaktanschrift: Dr. Leo Pehl, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Forst, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig