

Adhäsionskraft durchgeführt. Zum anderen weisen erste rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen auf Wachsbildungen bei Wildreben hin.

066-Schildberger, B.; Grießbacher, A.

Höhere Bundeslehranstalt für Wein- und Obstbau, Wien

Bekämpfung von Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) und Bestimmung deren Mykotoxinbildung

Nach vereinzelt Beobachtungen von Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) in verschiedenen Weinbauregionen Österreichs ist seit dem Jahr 2010 ein erstmaliges verstärktes Auftreten wahrzunehmen. Ein Ziel der Untersuchung war es den Einfluss verschiedener Wirkstoffe auf das Wachstum von Schwarzfäule zu untersuchen. Um die Wirksamkeit der einzelnen Wirkstoffe zu testen, wurde im Labor das Wachstum von Schwarzfäule sowohl bei protektiver, wie auch bei kurativer Behandlung untersucht. Beim Plattendiffusionstest wurde die Wirksamkeit der einzelnen Wirkstoffe bei unterschiedlichen Konzentrationen unter Berücksichtigung der Bildung von Hemmhöfen untersucht. Diese Untersuchungen bestätigten die gute Wirkung verschiedener Pflanzenschutzmittel aus den Wirkstoffen der Strobilurine und Triazole. Die Pflanzenschutzmittel mit den Wirkstoffen Kupferoktanoat (Cueva[®]) und Kupferhydroxid (Cuprozin[®] flüssig) hingegen, zeigten keine ausreichende Wirkung gegen Schwarzfäule.

Aufgrund der Tatsache, dass einige Schimmelpilzarten, welche auf Weintrauben gefunden werden, die Mykotoxine Ochratoxin A und Patulin produzieren, galt es herauszufinden, ob diese Mykotoxine auch bei einem Befall durch Schwarzfäule produziert werden.

Mykotoxine sind toxische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, welche für eine Gesundheitsschädigung verantwortlich sind. Mittlerweile sind mehr als 400 verschiedene Mykotoxine bekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass noch mehrere Tausend unentdeckt sind. Für Lebensmittel sind jedoch nur einige wenige von Bedeutung, unter anderen Aflatoxinen, Ochratoxin A sowie Patulin. Die eigentliche Funktion der Bildung von Mykotoxinen ist derzeit noch nicht bekannt, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese gebildeten Gifte zur Ausschaltung anderer Mikroorganismen, die eine Konkurrenz darstellen, dienen.

Für die Mykotoxinuntersuchung der Trauben wurden sowohl für Ochratoxin A wie auch für Patulin befallene Beeren aus dem Freiland vom Stielgerüst gewonnen und als Maische untersucht. Parallel zur Vorbereitung der Trauben erfolgte die Untersuchung des Mykotoxingehaltes im Labor. Diese parallele Testung soll sicherstellen, dass es zu keiner Mykotoxinbildung durch andere, möglicherweise auf den Beeren aus dem Freiland befindliche Pilze gekommen ist. Die Untersuchung auf Ochratoxin A erfolgte mittels ELISA, die Testung auf Patulin mittels HPLC.

Bei diesen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch Ochratoxin A und Patulin, zwei der am häufigsten bei Trauben gefundenen Mykotoxine, nicht nachgewiesen werden.

067-Walter, R.; Altmayer, B.; Kortekamp, A.

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinland

Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweises zur Identifizierung von *Penicillium*-Arten an der Weinrebe

Development of a method for the molecular identification of Penicillium species on grapes

Pilze der Gattung *Penicillium* spec. verursachen die Grünfäule an Trauben. Dabei können sie Metabolite bilden, die die Mostqualität negativ beeinträchtigen. Seit 2004 werden am DLR Rheinland in Screenings die *Penicillium*-Arten bestimmt, die die typischen Krankheitssymptome an Trauben verursachen. Durch verschiedene molekularbiologische Verfahren konnten bisher 724 Isolate identifiziert werden. Mit 673 Isolaten war *P. expansum* der Haupterreger der Krankheit an Trauben. Weitere 25 Isolate wurden als *P. minioluteum*, 13 als *P. crustosum*/ *P. commune*, sechs als *P. purpurogenum* und drei als *P. spinulosum* identifiziert. Weitere vier Einzelbefunde wurden den Arten *P. aurantiogriseum*, *P. janthinellum*/ *P. griseovulvum*, *P. solitum*/ *P. echinulatum* und *P. thomii* / *P. purpurescens* zugeordnet.

Spezifischer Nachweis von *P. expansum*

Ein spezifischer Nachweis von *P. expansum*, dem Hauptverursacher der Grünfäule an Trauben, wurde mittels PCR mit den Primern PEF und PER nach MAREK ET AL. (2003) zuverlässig und reproduzierbar durchgeführt. Bei der

Art *P. expansum* wurde ein PCR-Produkt von 404 bp amplifiziert. Bei anderen *Penicillium*-Arten findet keine Amplifizierung statt.

Sequenzierung der ITS-Region

Verschiedene *Penicillium*-Arten können anhand unterschiedlicher Nucleotidsequenzen innerhalb der ITS-Region (internal transcribed spacer) voneinander unterschieden werden. Für die Amplifizierung der ITS-Region wurden die Primer ITS4 und ITS5 nach White et al. (1990) eingesetzt. Es folgte eine Sequenzierung des circa 600 bp großen PCR-Amplifikats. Durch einen Abgleich der Nucleotidsequenzen mit Daten aus der Gendatenbank (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die Arten bestimmt. Eng miteinander verwandte Arten, wie beispielsweise *P. crustosum* / *P. commune*, lassen sich mittels ITS-Sequenzierung jedoch nicht immer eindeutig einer bestimmten *Penicillium*-Art zuordnen.

Entwicklung eines molekularbiologischen Verfahrens zur Unterscheidung von *P. crustosum* und *P. commune*.

Die eindeutige Zuordnung von *P. crustosum* und *P. commune* zu einer der beiden Arten ist jedoch von besonderem Interesse, da einige *P. crustosum*-Isolate *in vitro* das stark nierenschädigende und kanzerogene Mykotoxin Ochratoxin A bilden können. Für die Entwicklung eines spezifischen Nachweisverfahrens wurde ein PCR-Verfahren des Cytocromoxidase-Gens (co1) mit anschließender spezifischer Restriktion mit dem Enzym HpyF3I entwickelt. Basierend auf den vorliegenden Sequenzdaten des co1-Gens schneidet das Enzym HpyF3I die Sequenz von *P. crustosum* an zwei Stellen, die von *P. commune* an einer Stelle. Die gesamte co1-Sequenz wurde mit den Primern PenF1 und AspR1 nach SEIFERT ET AL. (2007) amplifiziert. Bei fünf der insgesamt sechs geprüften *P. crustosum* und *P. commune* Referenzstämmen von CBS erbrachte die Restriktion des Amplifikats mit HpyF3I die erwarteten Schnittmuster. Alle vier geprüften *P. commune*-Stämme wiesen die erwarteten zwei geschnittenen Fragmente auf und drei der insgesamt vier geprüften *P. crustosum*-Referenzen zeigten die erwarteten drei Fragmente. Eine *P. crustosum*-Referenz wies lediglich zwei Fragmente auf (wie *P. commune*). Aus der Historie des Stammes geht jedoch hervor, dass das Isolat vor 1975 als *P. commune* eingestuft war. Die Ursache für die Abweichungen von den anderen geprüften Isolaten könnten mögliche Mutationen in der Zielsequenz sein.

Literatur

MAREK, P., T. ANHAMALAI, K. VENKATANARAYANAN, 2003: Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. International Journal of Food Microbiology, 89, 139 - 144.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, J.W. TAYLOR, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (eds.): PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, 315 - 322.

SEIFERT, K. A., R. A. SAMSON, J.R. DEWAARD, J. HOUBRAKEN, C.A. LÉVESQUE, J.-M. MONCALVO, G. LOUIS-SEIZE, P.D.N. HEBERT, 2007: Prospects for fungus identification using CO 1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 3091 - 3906.

Danksagung

Die Arbeiten wurden in einem vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Projekt am DLR Rheinpfalz in Neustadt an der Weinstrasse (Förderkennzeichen 2810HS016) durchgeführt.

068-Kecskeméti, E.; Brathuhn, A.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Reineke, A.

Forschungsanstalt Geisenheim

Vorkommen von Transposons und Mykoviren in *Botrytis cinerea* Stämmen und ihr Einfluss auf deren Phänotyp

Bei phytopathogenen Pilzen kann die Ausprägung phänotypischer Merkmale maßgeblich von der Anwesenheit bestimmter genetischer Elemente (z. B. Transposons) sowie durch Infektionen mit pilzlichen Viren (Mykoviren) manifestiert werden. Vor diesem Hintergrund wurden in den Jahren 2008, 2009 und 2010 *Botrytis cinerea*-Isolate von Trauben der Rebsorte 'Riesling' (*Vitis vinifera* L.) aus insgesamt elf Weinbergen des Anbaugebietes Rheingau (49°59'N, 7°57'E) isoliert. Die Probenahmestandorte unterscheiden sich hinsichtlich des Bewirtschaftungssystems (integriert, biologisch-organisch, biologisch-dynamisch), der Stickstoffdüngung (0, 60 und 150 kg N/ha*a) sowie der Standorteigenschaften (Rebflächen aus „Terroir“-Projekt).

Insgesamt wurden 100 *B. cinerea*-Isolate gewonnen und Einsporlinien hergestellt. Nach Kultivierung auf Kartoffel-Dextrose-Agar wurde die DNA mittels MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit isoliert. Die Transposons Boty (Primer BotyLTR98 und BotyLTR728) und Flipper (Primer F300 und F1550) wurden nach den Methoden von DIOLEZ et al. (1995) und MUÑOZ et al. (2002) mittels PCR amplifiziert. Anhand des Vorhandenseins der Transposons „Boty“ und „Flipper“ und nach Verdauung des amplifizierten Bc-hch Gens (Primer 262 und 520L) mit dem