

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

Restriktionsenzym HhaI wurden die Einzelisolate in Gruppe I und II klassifiziert (FOURNIER et al. 2003). Zusätzlich wurde mit den von Boine et al. (2009) publizierten Primern die Anwesenheit der Mykoviren „BVX“ und „BVF“ in den *B. cinerea*-Isolaten untersucht.

Fast alle Isolate (97 %) waren im Besitz eines oder beider Transposons, während 31 % der Isolate eines der beiden Mykoviren (überwiegend BVF) oder beide Virustypen aufwiesen. Um die Auswirkungen dieser Elemente auf die phänotypischen Eigenschaften der jeweiligen Stämme zu untersuchen, wurden repräsentativ einige der *B. cinerea*-Isolate ausgewählt (+/- Transposon/Mykovirus). Die beiden Parameter Myzelwachstum *in vitro* bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C; 7 °C; 10 °C; 15 °C; 20 °C; 25 °C; 30 °C) und Laccase-Aktivität (photometrische Bestimmung) wurden näher untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass *B. cinerea*-Stämme, die mit dem Mykovirus BVF infiziert sind, bei niedrigen Temperaturen ein signifikant geringeres Myzelwachstum *in vitro* und eine reduzierte Laccase-Aktivität aufwiesen, als virusfreie Stämme oder solche mit Mykovirus BVX.

Literatur

- BOINE, B., PEARSON, M. N., BEEVER, R., BAILEY, A., FOSTER, G., 2009: Molecular tools for studying the interaction between *Botrytis* and the viruses BVX and BVF. IOBC/WPRS Bulletin 43: 49 - 52.
- DIOLEZ, A., MARCHES, F., FORTINI, D., BRYGOO, Y., 1995: Boty, a Long-Terminal-Repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology 61(1): 103 - 108.
- FOURNIER, E., LEVIS, C., FORTINI, D., LEROUX, P., GIRAUD, T., BRYGOO, Y., 2003: Characterization of Bc-her, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. Mycologia 95(2): 251 - 261.
- MUÑOZ, G., HINRICHSSEN, P., BRYGOO, Y., GIRAUD, T., 2002: Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. Mycological Research 106: 594 - 601.

069-Kögel, S.¹⁾; Gross, J.²⁾; Hoffmann, C.²⁾

¹⁾ Dr. Knoell Consult GmbH

²⁾ Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen

Die Beeinflussung des Weingeschmacks durch die Marienkäferarten *Harmonia axyridis* und *Coccinella septempunctata*

The influence on the sensory properties of wine by the ladybird beetles Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata

The multicolored Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis* is an invasive species originating from East Asia. It was introduced to North America and Central Europe as a biological control agent. *H. axyridis* has spread all over these countries capable to become an increasing problem for winegrowers. The Asian ladybird beetle feeds on damaged fruits in late summer and in autumn, especially on grapes. By getting harvested and processed together with the grapes, it causes an off-flavor in the wine, the so-called 'ladybird taint' (LBT), due to the release of hemolymph (containing mainly pyrazines) into the must. Sensory trials on Riesling and Pinot Noir wines produced in 2009 with added live beetles of *H. axyridis* showed that the LBT is detectable at a threshold of 5 beetles/ kg of grapes. But the sensory detection depends on the winemaking practices: crushed must fermentation increased the detection limit of the LBT compared to must heating. The sensory detection threshold for LBT in must fermented wines was about 3 beetles/ kg of grapes, and in must heated wines about 5 beetles/ kg of grapes. In the white wine variety Riesling, the sensory detection threshold for LBT was similar to Pinot noir after must heating 5 beetles/ kg of grapes. The main olfactory active compound causing LBT, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP), was detected by 50 % of panelists at a threshold of 1 ng/L in Riesling and 2 ng/L in Pinot noir. Thus, a threshold of five beetles with an average amount of IPMP (see Cai et al. 2007) each in hemolymph processed within 1 kg of grapes can reach the human detection limit of 1 - 2 ng IPMP/L of wine. In the 1970ies and 80ies the wine quality in German wine growing regions suffered from a contamination with chemical compounds of *Coccinella septempunctata* (7-spot ladybird beetle). Cudjoe et al. (2005) found that *H. axyridis* has a hundred-fold higher quantity of pyrazines in hemolymph than *C. septempunctata*. Therefore it was unknown whether there is a difference in the quantity of beetles of the two species necessary to deteriorate wine quality. In order to answer this question, Riesling wines from 2008 were compounded with the hemolymph of both species in triplicate. Eight or 16 beetles, respectively, were crushed in 6 ml bidest. water and centrifugated. The hemolymph was added to the wine corresponding to 8 or 16 beetles per liter. A sensory panel of 10 persons characterized the intensity of the LBT. Interestingly, the wines contaminated by 7-spot ladybird beetle showed a significant higher intensity of altered wine than the wines contaminated by *H. axyridis*.

Further analysis using headspace solid phase micro extraction (HS-SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and GC-olfactometry (GC-O) showed, that in relation to *C. septempunctata*, the multicolored Asian ladybird beetle had more nitrogen containing compounds in the hemolymph, mainly IPMP and 2-sec