

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

Entwicklung von Immunochemischen und PCR-Methoden zum Qualitativen

Nachweis von *Tilletia*-Arten und *Ustilago nuda* in Saatgut

Thomas Georg Kellerer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h .c. J. Bauer

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. K. Kramer
2. Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Die Dissertation wurde am 06.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.12.2009 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	5
1.1	Brandpilze im Getreide .....	5
1.2	Biologie der Brandpilze .....	9
1.2.1	Steinbrand – <i>Tilletia caries</i> .....	9
1.2.2	Zwergsteinbrand – <i>Tilletia controversa</i> .....	11
1.2.3	Indischer Steinbrand – <i>Tilletia indica</i> .....	11
1.2.4	Gerstenflugbrand – <i>Ustilago nuda</i> .....	12
1.3	Zielsetzung .....	13
2	MATERIAL UND METHODEN .....	16
2.1	Verwendetes Material .....	16
2.1.1	Chemikalien .....	16
2.1.2	Lösungen und Puffer .....	17
2.1.3	Kits .....	21
2.1.4	Enzyme .....	21
2.1.5	Antikörper .....	22
2.1.6	Standards .....	22
2.1.7	Proteine .....	23
2.1.8	Oligonucleotide .....	23

2.1.9	Pflanzen und Pilzmaterial .....	23
2.1.10	Geräte.....	25
2.1.11	Sonstige Materialien .....	27
2.1.12	Computerprogramme und Webtools.....	28
2.2	Präparative und molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1	Ernte von Brandpilz befallenen Weizen- und Gersten-Ähren .....	28
2.2.2	Isolierung und Reinigung von DNA.....	29
2.2.3	PCR Methoden.....	31
2.2.3.1	Klassische PCR .....	31
2.2.3.2	Real Time PCR.....	33
2.2.4	Proteinextraktion aus Sporen und Gerstenkörnern .....	35
2.2.5	Gewinnung der Antikörper .....	35
2.3	Proteinchemische Methoden .....	36
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	36
2.3.2	Färbung der SDS-Gele nach Fairbanks und Coomassie.....	37
2.3.3	Elektroelution von Proteinen aus SDS-Gelen.....	38
2.3.4	Immunoblotting (Western Blot).....	39
2.3.5	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40
2.4	Mikroskopische Methoden.....	41

2.4.1	Lichtmikroskopie .....	41
2.4.2	Raster-Elektronenmikroskopie .....	43
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	45
3.1	<i>Tilletia</i> -Nachweis mit polyklonalen Antiseren .....	47
3.1.1	Western Blot .....	47
3.1.1.1	<i>Tilletia caries</i> .....	47
3.1.1.2	<i>Tilletia controversa</i> .....	48
3.1.2	Natriumperjodat-Behandlung nach Woodward <i>et al.</i> (1985) .....	49
3.1.3	Nachweisgrenze .....	49
3.1.4	ELISA .....	51
3.2	<i>Tilletia</i> -Nachweis mit monoklonalen Antikörpern .....	52
3.2.1	Sequenzanalyse und Suche nach möglichen Antikörperbindestellen.....	52
3.2.2	Ermittlung der fehlenden Sequenz von <i>T. caries</i> .....	54
3.2.3	Entwicklung spezifischer synthetischer Peptide.....	55
3.2.4	Monoklonale Antikörper.....	57
3.3	<i>Tilletia</i> -Nachweis mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	59
3.3.1	Sequenzanalyse .....	59
3.3.2	Primerdesign .....	59
3.3.3	PCR-Test auf <i>Tilletia</i> .....	60

3.3.3.1	Temperaturoptimierung .....	60
3.3.3.2	Nachweisgrenze .....	61
3.3.3.3	Validierung der Primer .....	62
3.3.4	Quantifizierung mit der Real Time PCR .....	68
3.4	ELISA <i>U. nuda</i> .....	74
3.5	Ringversuche .....	80
3.5.1	Ringversuch <i>Tilletia</i> .....	80
3.5.1.1	Western Blot-Nachweis .....	80
3.5.1.2	PCR-Nachweis .....	82
3.5.2	Ringversuch <i>U. nuda</i> .....	84
4	ZUSAMMENFASSUNG .....	86
5	ANHANG .....	90
5.1	Veröffentlichungsliste .....	90
5.2	Marker und Proteinstandards .....	91
5.3	Weitere Abbildungen .....	92
6	ABKÜRZUNGEN .....	94
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	97

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Brandpilze im Getreide

Die Produktion von Weizen und Gerste wird oft durch Pilzkrankheiten wie z.B. Roste und Brände beeinträchtigt. Dies zeigt sich in einem geringeren Ertrag sowie einer deutlich schlechteren Produktqualität bis hin zur Nichtverwendbarkeit, insbesondere im Öko-Landbau.

Brandkrankheiten werden durch Pilze der Gattung *Tilletia* (Steinbrand, Zwergsteinbrand, Indischer Steinbrand und weitere) und *Ustilago* (z.B. Flugbrand) verursacht. Unter den samen- und bodenbürtigen Brandkrankheiten sind der Weizensteinbrand - auch Stinkbrand genannt - (*Tilletia caries*), der Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*), beide zur Gruppe der Basidiomyceten gehörend, sowie der Gerstenflugbrand (*Ustilago nuda*) die gefährlichsten. Der Quarantäneschädling Indischer Steinbrand (*Tilletia indica*) ist in Europa bisher noch nicht aufgetreten, stellt aber eine latente *Bedrohung* dar (Sansford *et al.* 2006).

*Tilletia controversa* tritt vor allem in Süddeutschland und Österreich in höheren Lagen mit längerer Schneedecke auf, hat also regionale Bedeutung. *Tilletia* Arten treten hauptsächlich an Kulturweizen auf, aber auch an Roggen, Triticale, Gerste und zahlreichen Kultur- und Wildgräsern. Auffällig ist der tranige fischartige Geruch der Sporen, verursacht durch das Toxin Trimethylamin. Befallene Partien können wegen der Geruchs- und Geschmacksbeeinträchtigungen nicht mehr als Mahl- oder Futterweizen verkauft werden.



*T. caries* und *T. controversa* stehen sich taxonomisch sehr nahe. Kreuzungen zwischen den Arten sind nachgewiesen (Holton, 1954; Silbernagel, 1964) und werden zum Teil auch als Varianten einer Art angesehen (Russel und Mills, 1994; Shi *et al.*, 1996). Bei Steinbrand- und Zwergsteinbrandbefall bilden sich in den Ähren keine Körner, sondern stattdessen die kornähnlich geformten sogenannten Brandbutten, die dunkelbraune, unangenehm riechende Sporen beinhalten und die pilzliche Fortpflanzungsform darstellen (vgl. Abb. 1 und 2). Jede Brandbutte enthält ca. vier Millionen Sporen



Abb. 2: Weizenähre mit Brandbutten (Pfeile), verursacht durch den Pilz *Tilletia controversa*.

(Johnsson, 1973). Beim Dreschvorgang stäuben die Brandsporen aus und gelangen auf den Boden oder kontaminieren das Erntegut selbst. Bei trockener Lagerung und Raumtemperatur behalten die Steinbrandsporen ihre Keimfähigkeit bis zu 20 Jahre und auch im Boden können *Tilletia* Sporen bis zu fünf Jahre überdauern (Voit *et al.*, 2007; Babadoost *et al.*, 1998 und 2004).



Abb. 3: Gerstenähre mit Sporenlager verursacht durch den Pilz *Ustilago nuda*.  
Quelle: www.darzau.de

Beim Flugbrand hingegen enthalten die Ähren statt Kornanlage und Spelzen dunkelbraune bis schwarze Sporenmassen, die zunächst von einem silbrigen, dünnen Häutchen umschlossen sind. Nach dem Ährenschieben reißt es auf, und die Brandsporen stäuben unter Einwirkung von Wind aus, so dass schließlich bei der Getreidereife nur noch die nackten, etwas geschwärzten, aufrecht stehenden Ährenspindeln zurückbleiben (vgl. Abb. 3).

Die regelmäßige Anwendung chemischer Beizmittel hat dazu geführt, dass im konventionellen Getreidebau in den zurückliegenden Jahrzehnten keine nennenswerten Schäden mehr durch Brandpilzbefall aufgetreten sind. Dies gilt nicht im Ökologischen Landbau, da hier keine chemischen Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden dürfen. Zudem endete am 31. Dezember 2003 die Ausnahmemöglichkeit (EU-Verordnung Nr. 2091/92, Artikel 6 (3)) konventionell erzeugtes Saatgut im Ökologischen Landbau

einzusetzen. Somit stellen Brandkrankheiten nach wie vor eine ernste Gefahr dar (Koch und Spieß, 2002) und es wird daher mit einer Zunahme von samen- und bodenbürtigen Krankheitserregern vor allem bei Öko-Saatgut zu rechnen sein, weshalb zwingender Handlungsbedarf geboten ist. Aber auch im konventionellen Landbau ist immer wieder Brandsporenbefall an Weizen zu beobachten, da die Landwirte aufgrund immer enger werdender ökonomischer Rahmenbedingungen sog. "Billig-Beizmittel" oder gutwirkende Beizmittel mit zu geringen Aufwandmengen anwenden. Insbesondere *T. caries*, eine Krankheit, die im konventionellen Anbau in den letzten 40 Jahren nahezu bedeutungslos geworden war, erreicht bei Unterlassung der Saatgutbeizung schnell wieder ein wirtschaftlich relevantes Ausmaß (Jahn *et al.*, 2003). Um die Problematik der immer weiter steigenden Brandsporenbelastung in den Griff zu bekommen, sind unter anderem pflanzenbauliche und phytosanitäre Maßnahmen zu ergreifen. Von den zur Verfügung stehenden Maßnahmen zur Vermeidung oder Reduktion des Befalls mit Brandpilzen kann neben der Prophylaxe wie Saatzeit, Saattiefe, Fruchtfolge und die Saatgutbehandlung auch auf die Verwendung resistenter Sorten zurück gegriffen werden. Für die Saatgutbehandlung zur Steinbrandbekämpfung wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden vorgeschlagen. Dazu zählen physikalische Verfahren wie die Saatgutreinigung in konventionellen Reinigungsanlagen oder mit Spezialgeräten wie der Getreidewäsche (Spiess und Dutschke, 1991) oder der Bürstmaschine, die Behandlung mit Warmwasser (Winter *et al.*, 1994), feucht-heißer Luft (Forsberg *et al.*, 2002) oder niederenergetischen Elektronen (Burth *et al.*, 1991) sowie die Applikation von Mikroorganismen (Höckeberg *et al.*, 1997) und Naturstoffen wie z.B. das Pflanzenstärkungsmittel Tillecur<sup>®</sup> auf Senfmehlbasis (Spiess und Dutschke, 1991; Becker und Weltzien, 1993; Paffrath und Tränkner, 1998; El-Naimi *et al.*, 2000; Spiess und Koch, 2004). Auf Grund erhöhter Kosten ist allerdings nur bei geringem Befall (max. 100 Sporen pro Korn) eine derartige Behandlung sinnvoll. Zudem kann nur eine Verringerung des Befalls erwirkt werden. Im Falle der überwiegend bodenbürtigen Zwergsteinbrandinfektionen ist allerdings bei keinem dieser Verfahren eine ausreichende Wirksamkeit zu erwarten, es sei denn, die applizierten Agenzien würden in der Pflanze eine Resistenz induzieren oder Antagonisten im Boden fördern.



In vielen Fällen reicht eine Behandlung nicht aus, z. B. wenn Saatgut als Konsumware oder Nachbasaatgut Verwendung finden soll. Vor allem im Ökologischen Anbau darf nur befallsfreies Saatgut verwendet werden, um eine Akkumulation der Sporen unter anderem im Boden zu verhindern. Eine Sporenbelastung von  $< 20$  Sporen pro Korn ist noch zulässig (vgl. 2.4.1). Aus diesem Grund sind zusätzlich zu den phytosanitären Maßnahmen hocheffiziente Methoden für den Nachweis und die Unterscheidung der Pilzsporen notwendig, denn nur damit sind Voraussetzungen gegeben, um Saatgut auf seinen Befall mit samenbürtigen Krankheitserregern untersuchen sowie seine Anbautaughlichkeit überprüfen zu können. Auch für Quarantänebestimmungen sind hocheffiziente Nachweismethoden eine Grundvoraussetzung, um schnelle und sichere Entscheidungen über Ex- und Import treffen zu können.

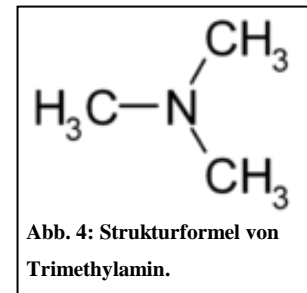
Für den Sporennachweis bei Weizen werden bisher weltweit hauptsächlich die Methoden der ISTA (International Seed Testing Association, Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No. 53) verwendet, mit denen der Nachweis optisch mit der Filtrations- bzw. Hämocytometer-Methode unter dem Mikroskop durchgeführt wird. Bei der Gerste wird der Flugbrand über die Embryomethode festgestellt (ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No. 48). Hier werden in einer sehr aufwendigen Prozedur zunächst die Embryonen vom restlichen Korn getrennt und anschließend das Scutellum unter dem Mikroskop auf Pilzmyzel untersucht (vgl. 2.4.1). Eine eindeutige Unterscheidung der Sporen bzw. Feststellung von Myzel der unterschiedlichen Arten ist nur mit erheblichem Zeitaufwand möglich. Zudem handelt es sich bei der Ermittlung der Sporen nur um eine indirekte Quantifizierung (Hochrechnung). Auf Grund der hohen morphologischen Übereinstimmungen der Pilzsporenoberflächen ist allerdings die Differenzierung schwierig und fehleranfällig, und eine eindeutige Bestimmung nicht immer möglich (Trione *et al.*, 1997).

Neben diesen Nachweismethoden besteht die Möglichkeit Brandsporen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop zu analysieren (Stockwell, 1986). Dieses Verfahren hat jedoch keinen Einzug in die Routineuntersuchung gefunden, da keine Quantifizierung möglich und zudem ein Fluoreszenz-Mikroskop in der Anschaffung sehr teuer ist.

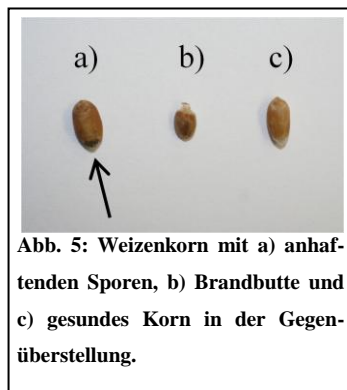
## 1.2 Biologie der Brandpilze

### 1.2.1 Steinbrand – *Tilletia caries*

Die Infektion beginnt mit dem Auflaufen der Weizenpflanzen und verläuft in den frühen Stadien zunächst recht unauffällig. Die erkrankten Pflanzen unterscheiden sich äußerlich kaum von den gesunden Weizenpflanzen. Erst spät zeigen sich deutliche Symptome des Befalls. Die Ähren der infizierten Pflanzen sind auffällig gespreizt. Ihre Körner entpuppen sich bei näherer Betrachtung als ein Sporenlager des Pilzes *T. caries*, sogenannte Brandbutten. In ihrem Inneren lagern dicht gedrängt ca. vier Millionen Sporen (Johnsson, 1973). Ihre dunkle Färbung gab ihnen den Namen Brandsporen. Einfache Stickstoffverbindungen wie das Trimethylamin (vgl. Abb. 4) verursachen den für die Krankheit charakteristischen fischartigen Geruch. Daher auch die landläufige Bezeichnung Stinkbrand. Bei der Ernte gelangen die infizierten Ähren zusammen mit dem gesunden Getreide in die Dreschtrommel. Hier werden die Brandbutten zerschlagen und geben ihren



infektiösen Inhalt frei. Die mikroskopisch kleinen Brandsporen stäuben aus und verteilen sich im Inneren des Mähdreschers. Auch in den feinen Samenhaaren der



gesunden Getreidekörner setzen sich Sporen fest (vgl. Abb. 5a, Pfeil). Bei starkem Befall nimmt die gesamte Partie den fischartigen Geruch der Pilzsporen an und wird ungenießbar. Ein geringer Befall bleibt jedoch häufig unbemerkt. Wird sporenbesetztes Getreide ohne eine vorhergehende Beizung als Saatgut verwendet, bildet es den Ausgangspunkt für eine neue Infektion.

Nach der Aussaat erwachen die über Jahre keimfähigen Brandsporen im Boden zu neuem Leben (vgl. Abb. 6). Die beiden genetisch unterschiedlichen Kerne im Inneren der Spore verschmelzen miteinander. In einer zweistufigen meiotischen Teilung wird das genetische Material neu verteilt. Durch anschließende mitotische Teilungen entstehen schließlich acht haploide Kerne. Die Brandspore beginnt zu keimen, ein Promycel wächst aus. An seinem Ende bilden sich acht fingerförmige Hyphen-

Auswüchse, die primären Sporidien. In jedes Sporidium wandert ein haploider Kern ein. Die einzelnen Sporidien bilden Hyphenbrücken aus und fusionieren paarweise. Während der Konjugation wandert einer der beiden Kerne in das benachbarte Sporidium über. Ausgehend von den konjugierten Sporidien bildet sich ein zweikerniges Mycel. Während zahlreiche Pilzhyphen das Korn überwachsen, beginnt das Getreide zu keimen. Es kommt zu einer Keimlingsinfektion. Durch die Koleoptile dringen die Hyphen in das Innere der Pflanze vor (Churchward 1940, Hansen 1958, Swinburne 1963, Churchill und Mills 1984, Goates und Hoffmann 1978). Während die junge Weizenpflanze heranwächst, breitet sich in ihrem Inneren das Pilzmycel immer weiter aus. Erreicht der Pilz den Vegetationspunkt bzw. die Ährenanlage, bildet sich statt des Mehlkörpers unter den Samenschalen der befallenen Ähren ein dichtes Mycel. Nach und nach schnüren sich die Hyphen ein und verfestigen sich. Es entstehen wieder neue Brandsporen (Hansen 1958, Swinburne 1963). Die Spelzen erkrankter Ähren nehmen eine blaugrüne Färbung an und sind stärker abgespreizt als die von gesunden Pflanzen (Agrios 1988, Hoffmann und Schmutterer 1999). Durch die Samenschale geschützt überdauern die Sporen von *T. caries* bis zur nächsten Ernte.

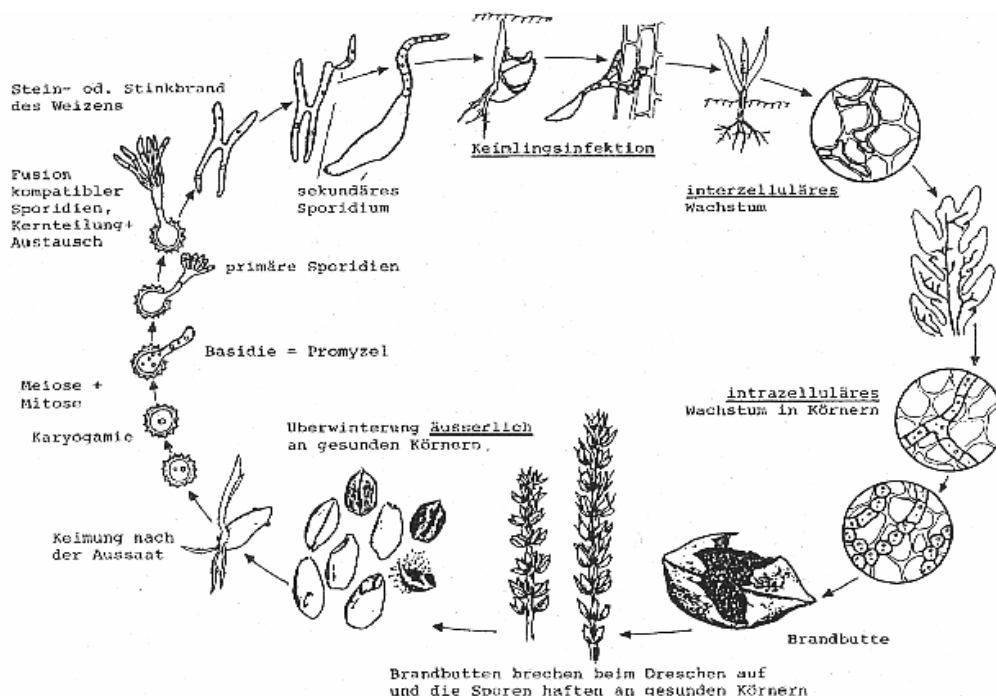


Abb. 6: Lebenszyklus des Weizensteinbrandes (*Tilletia caries*). Quelle:

[http://www.dapp.boku.ac.at/fileadmin/\\_/H95/H953-bilder/pdf-lehre/953303-02.pdf](http://www.dapp.boku.ac.at/fileadmin/_/H95/H953-bilder/pdf-lehre/953303-02.pdf)

### 1.2.2 Zwergsteinbrand – *Tilletia controversa*

Zwergsteinbrand entwickelt sich im Prinzip ähnlich wie der Steinbrand, nur dass der Infektionsweg ein anderer ist und das Mycel die Pflanze erst während der Bestockung infiziert. In beiden Fällen handelt es sich um eine Keimlingsinfektion, wobei das Korn beim Steinbrand über anhaftende Sporen infiziert wird, beim Zwergsteinbrand über Sporen im Boden, die ein Mycel ausbilden und erst bei Erreichen von Saatgut wieder dem Infektionsweg des Steinbrandes folgen. Zum Keimen der Zwergsteinbrandsporen im Boden sind besondere Bedingungen notwendig. Diffuse Lichtverhältnisse und Temperaturen von annähernd konstanten 8-10°C bilden eine optimale Voraussetzung. Solche Verhältnisse findet man häufig unter Schnee, der auf nicht gefrorenem Boden gefallen ist. Aber auch länger anhaltender Nebel scheint ausreichend zu sein, um eine Keimung der Zwergsteinbrandsporen zu begünstigen (Dressler *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Indischer Steinbrand – *Tilletia indica*

Der Quarantäneschädling *Tilletia indica* ist erstmals in den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts in Indien aufgetreten (Bedi, 1980). Bis heute hat er sich in Länder wie Pakistan, Irak aber seit 1996 auch nach Mexiko und in die USA verbreitet (Smiley, 1997). In Europa ist dieser Organismus bisher in der Natur nicht aufgetreten, stellt aber eine latente Bedrohung auf Grund der Globalisierung dar. Dies zeigt sich, dass *T. indica* in mehr als 40 Ländern einem strengen Importverbot unterliegt (Stein *et al.*, 2005), auch in Deutschland.

Ebenso wie für *T. caries* und *T. controversa* wird beschrieben, dass die Sporen gegenüber diversen Umwelteinflüssen sehr widerstandsfähig sind und 2-5 Jahre im Boden überleben können (Bonde *et al.*, 2004). Das Überdauern hängt ab von der Tiefe der Sporen im Boden, von der Feuchtigkeit und der Temperatur. Frost hingegen ist irrelevant.

Teliosporen an der Bodenoberfläche bzw. kurz darunter fangen langsam zum Keimen an. Während feuchter Bedingungen erfolgt eine Infektion über die Stomata der Spelzen (Hyphen sekundärer Sporidien), aber auch durch Einschwemmung in das noch

eingerollte Fahnenblatt. Ein hoher Infektionsdruck herrscht v.a. während der 2-3 Wochen langen Periode der Keimung. Sind die Hyphen der sekundären Sporidien durch die Stomataöffnungen eingedrungen, wachsen sie in der Pflanze bis zu den sich in der Ähre entwickelnden Körnern weiter. Dort werden dann neue Teliosporen für den nächsten Infektionszyklus gebildet (Kumar *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu *T. caries* und *T. controversa* werden die Körner nicht komplett durch Brandbutten ersetzt, sondern nur ein Teil des Korns dient als Sporenlager.

#### **1.2.4 Gerstenflugbrand – *Ustilago nuda***

Eine andere Gruppe von Brandpilzen, die vor allem in der Gerste und nur selten im Weizen auftreten, sind die Flugbrände. Der Gerstenflugbrand wird durch den Pilz *Ustilago nuda* verursacht. Die Sporenlager der Flugbrände sind im Gegensatz zu den harten Brandbutten der Steinbrände, nur von einem dünnen Häutchen überzogen. Während die gesunden Gerstenpflanzen anfangen zu blühen, platzen an den infizierten Ähren nach und nach die Sporenlager auf. Die Sporen stäuben aus und werden mit dem Wind davongetragen. Zahlreiche Pilzsporen gelangen dadurch auf die blühenden Ähren der gesunden Pflanzen. Die Sporen verfangen sich auf der Nabe des Blütchens. Hier beginnen sie zu keimen und infizieren zunächst das Perikarp des Fruchtknotens (vgl. Abb. 7). Es bildet sich ein septiertes Promycel aus vier Zellen mit je einem Kern. Die Kerne benachbarter Zellen sind genetisch unterschiedlich. Je zwei Zellen mit unterschiedlichen Kernen fusionieren. Ausgehend von diesen dikaryotischen Zellen bildet sich ein Paarkernmycel. Dieses Mycel durchwächst im Verlauf der Samenreifung die Randschichten des sich entwickelnden Korns und die Hyphen dringen bis zum Scutellum und schließlich dem Embryo der Wirtspflanze vor und infizieren ihn. Nach dieser Embryoinfektion, die charakteristisch für den Flugbrand ist, geht der Pilz in ein Ruhestadium über (Pedersen, 1956, Malik und Batts 1960a, Shinohara 1976, Hoffmann und Schmutterer 1999). Nach außen hin nicht sichtbar, bergen die heranreifenden Ähren eine neue Generation infizierter Gerstenpflanzen.

Mit der Keimung des Korns wird auch das Pathogen wieder aktiviert und infiziert den Vegetationspunkt der Keimpflanze, sofern dies nicht schon während der Samenreifung und Embryonalentwicklung geschehen ist. Außerdem besiedelt das Mycel junge Nodien

und Bestockungstriebe und wird im Wachstum der Pflanze mit nach oben getragen. In den sich entwickelnden Ähren werden die Wirtszellen zerstört, die Hyphen verzweigen sich stärker und werden schließlich in Brandsporen umgewandelt (Malik und Batts 1960b).

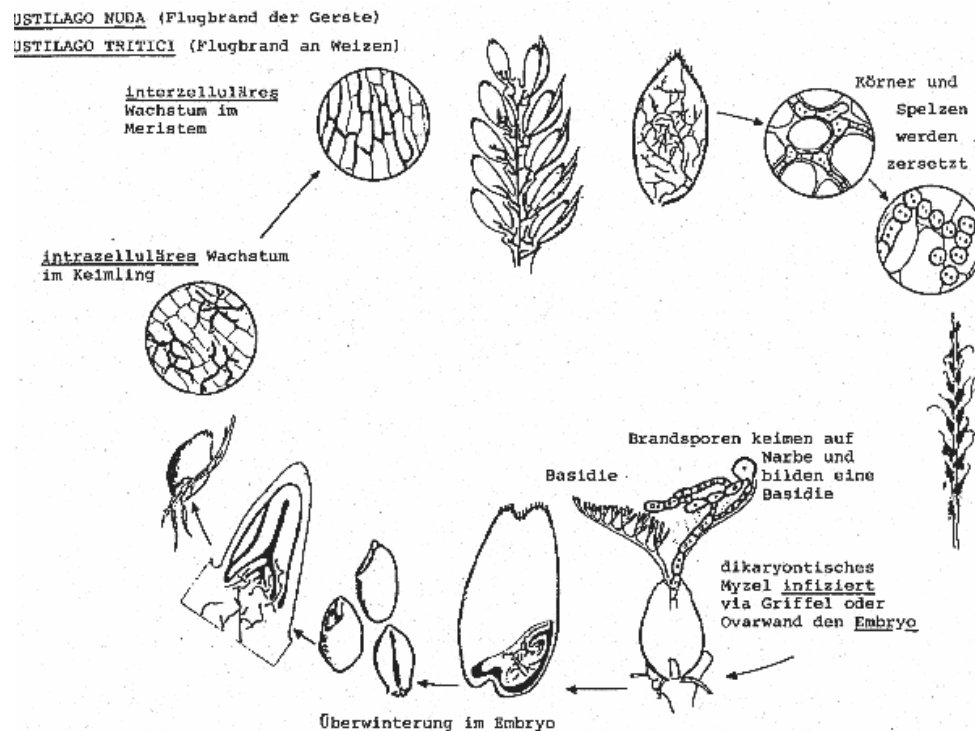


Abb. 7: Lebenszyklus des Gerstenflugbrandes (*Ustilago nuda*). Quelle:

[http://www.dapp.boku.ac.at/fileadmin/\\_/H95/H953-bilder/pdf-lehre/953303-02.pdf](http://www.dapp.boku.ac.at/fileadmin/_/H95/H953-bilder/pdf-lehre/953303-02.pdf)

### 1.3 Zielsetzung

Da bei Steinbrand in Deutschland 4-5 und international bis zu 15 unterschiedliche physiologischen Rassen auftreten (Spieß, 2005; persönliche Mitteilung) muss ein Nachweisverfahren auch dahingehend optimiert werden, dass die verschiedenen physiologischen Rassen als *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* oder *Tilletia indica* erkannt werden. In der Vergangenheit lag das Hauptaugenmerk auf dem Gebiet der Brandsporenforschung bei *T. caries*, da dieser im ganzen Bundesgebiet verbreitet ist. Das Vorkommen von *T. controversa* hingegen beschränkte sich auf Grund seiner Fortpflanzungsbiologie bisher auf Mittelgebirgslagen um die 1000 Höhenmeter. In den

letzten Jahren findet man *T. controversa* vermutlich wegen des Klimawandels auch in niedrigeren Lagen bis zu 500 m, so dass dieser Brandpilz zunehmend an wirtschaftlicher Bedeutung gewinnt und somit auch in den Fokus der Forschung gelangen muss. Durch das verstärkte Auftreten beider Brandpilze auch gemeinsam in einer Saatgutprobe vor allem in den Bundesländern Bayern, Baden-Württemberg und Sachsen wird es zukünftig immer wichtiger, in einem Arbeitsschritt beide Pilze qualitativ und quantitativ sicher und zuverlässig nachzuweisen und zu unterscheiden.

Da *Ustilago*-Arten derzeit nicht die große wirtschaftliche Bedeutung haben, liegt das Hauptaugenmerk der Forschungsarbeiten auf den *Tilletia*-Arten.

Ein großes Problem bei der Anerkennung von Winterfrüchten ist die knappe Zeit von der Ernte bis zur Aussaat. Dazwischen muss das gesamte Anerkennungsverfahren abgeschlossen sein. Probenahme, Saatgutuntersuchung und der Erlass der Bescheide über Anerkennung oder Ablehnung müssen optimiert und aufeinander abgestimmt werden. Eine Verzögerung von nur wenigen Tagen kann in der Zeit von Ende Juli bis Anfang Oktober unter Umständen große finanzielle Schäden verursachen. Um trotz knapper Personalressourcen in diesem politisch und wirtschaftlich brisanten Bereich die Hoheitsaufgaben zuverlässig erfüllen zu können, ist es zwingend notwendig hocheffiziente genomdiagnostische und immunochemische Methoden zu entwickeln und zu etablieren.

In dieser Arbeit sollen zwei Methoden entwickelt werden, um Gerstenflugbrand (*Ustilago nuda*) sowie die wichtigsten und gefährlichsten *Tilletia* Arten - Steinbrand (*T. caries*), Zwergsteinbrand (*T. controversa*) und den Quarantäneschädling Indischer Steinbrand (*T. indica*) - nicht nur nachzuweisen, sondern auch sicher und zuverlässig voneinander zu unterscheiden. Als Werkzeuge stehen immunochemische (Western Blot, ELISA) und genomdiagnostische (PCR, Real Time PCR) Methoden zur Verfügung.

Seit der Einführung des ELISA zur Diagnose von Viruserkrankungen durch Clark und Adams (1977) haben auf der Reaktion von Antigenen mit spezifischen Antikörpern basierende Methoden in der gesamten Pflanzenpathologie weite Verbreitung gefunden (Clark 1981, Miller und Martin 1988, Goulter und Randles 1997, Eibel 2002) und

werden auch zunehmend in der Resistenzprüfung von Sorten eingesetzt. Die PCR hat einen ähnlichen Werdegang hinter sich und wurde bereits von Miller und Martin (1988) zur Diagnose von Pflanzenpathogenen verwendet. DNA Techniken sind ebenso wie immunochemische Verfahren durch hohe Spezifität und Nachweisempfindlichkeit gekennzeichnet.

Diese genomdiagnostischen und immunochemischen Methoden weisen gegenüber den herkömmlichen visuellen Methoden die großen Vorteile auf, dass neben der Eindeutigkeit der Ergebnisse sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage getroffen werden kann. In Zeiten, in denen die Rahmenbedingungen besonders auch im Bereich Saatgutuntersuchung immer enger werden und die Ergebnisse immer schneller bei den Betrieben sein müssen, stellt die Entwicklung neuer hocheffizienter quantitativer Methoden ein topmodernes Werkzeug zur Erreichung dieser Ziele dar. Zudem besteht ein weltweites Interesse an einem schnellen und zuverlässigen Nachweissystem (Zilke, 2007).

Langfristig sollen die in diesem Forschungsprojekt entwickelten Nachweismethoden international validiert werden und Eingang in das Methodenbuch der ISTA finden.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendetes Material

#### 2.1.1 Chemikalien

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Interchim (Cedex, Frankreich)
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 40 % (w/v, Acryl-/ Bisacrylamid 38:2)	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 30 % (w/v, Acryl-/ Bisacrylamid 29:1)	Biorad (München)
Agarose NEE0, ultra pure	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva (Heidelberg)
Ammoniumsulfat	Serva (Heidelberg)
$\beta$ -Mercaptoethanol, reinst	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blue (R-250)	Serva (Heidelberg)
Deoxynukleotide für PCR (dATP, dGTP, dTTP und dCTP)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München)
Essigsäure, p. A. / techn.	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, p. A.	Riedel de Haën (Seelze)
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Roth (Karlsruhe)
Glyzerin (99 %)	ICN Biomedicals (Eschwege)
Harnstoff	Sigma-Aldrich (München)
Isopropanol p.A.	Riedel de Haën (Seelze)
Methanol p. A.	Riedel de Haën (Seelze)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumperjodat	Acros Organics (New Jersey, USA)
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Roth (Karlsruhe)
p-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	Roth (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (München)
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Calbiochem, Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals (Eschwege)

Weitere verwendete Chemikalien stammen, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Merck in Darmstadt oder Firma Roth in Karlsruhe und hatten den Reinheitsgrad p.A. Alle Lösungen und Puffer wurden mit quartzbidestiliertem Wasser ( $H_2O_{dd}$ ) hergestellt.

Der pH-Wert aller Lösungen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweils angegebenen Temperatur eingestellt.

Bei der Verwendung von Kits und Enzymen wurden die jeweils von der Herstellerfirma empfohlenen und mitgelieferten Lösungen und Puffer benutzt.

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

#### *Lösungen für molekularbiologische Methoden*

TAE-Puffer (50x)	2 M 50 mM pH 8,0	Tris/Acetat pH 8,0 EDTA, pH 8,0 mit Eisessig
DNA-Gellösung	1,5 % (w/v) ad 1 x TAE → kochen	Agarose
	0,1 % (v/v)	EtBr-Stammlösung
DNA-Auftragspuffer (10x)	10 mM 50 % (v/v) 0,2 % (w/v) 0,2 % (w/v)	EDTA, pH 8,0 Glyzerin Bromphenolblau Xylencyanol
TE-Puffer (10/1)	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1 M	MgCl <sub>2</sub>
EDTA-Lösung	10 mM	EDTA, pH 8,0

Deoxynukleotid (dNTP)-Mix	10 mM	dATP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dTTP

*Lösungen für proteinchemische Methoden*

SDS-Lösung (10 %)	10 % (w/v)	SDS
Lämmli-Probenpuffer (5x)	300 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	10 % (w/v)	SDS
	50 % (v/v)	Glyzerin
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
	5 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol (Zugabe erst bei Gebrauch)
Laufpuffer (10x)	250 mM	Tris/HCl, pH 8,8
für SDS-PAGE	2 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
APS-Lösung (10 %)	10 % (w/v)	APS
Trenngel (TG) -Puffer (4x)	5 M	Tris/HCl
	0,8 % (w/v)	SDS
	pH 8,8	
Sammelgel (SG) -Puffer (2x)	250 mM	Tris/HCl
	0,4 % (w/v)	SDS
	pH 6,8	
Fairbanks Lösung A	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	technische Essigsäure
	0,05 %	Coomassie Blau R-250
Fairbanks Lösung D	10 %	technische Essigsäure

Färbelösung	0,25 % (w/v)	Coomassie Blau R-250
	40 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Entfärbung		Leitungswasser
<i>Westernblot:</i>		
Westernblot-	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
Inkubationspuffer	105 mM	Glycin,
	1,3 mM	SDS
	20 % (v/v)	MeOH
Alkalische Phosphatase	100 mM	Tris/HCl, pH 8,8
(AP) Puffer	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
NBT-Lösung	7,5 % (w/v)	NBT
	70 % (v/v)	DMF
BCIP-Lösung	5 % (w/v)	BCIP
	70 % (v/v)	DMF
PBS-Puffer (10x)	40 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	160 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.15 M	NaCl
	pH 7,4	
PBS-TWEEN (0,1 – 0,5 %)	0,1 % -	Tween <sup>20</sup>
	0,3 % (v/v)	
ad	1 x PBS	

Antikörperlösungen 1:1000 – 1:2000 primärer oder sekundärer Antikörper  
 ad PBS-Tween 0,1 %

*ELISA:*

Blockingreagens 0,5 % (v/v) Tween<sup>20</sup>  
 3 % (w/v) BSA  
 ad 1 x PBS

Antikörperlösungen 1:1000 – 1:2000 primärer oder sekundärer Antikörper  
 ad PBS-Tween 0,1

Alkalische Phosphatase 100 mM Tris/HCl, pH 8,8  
 (AP) Puffer 100 mM NaCl  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Färbereaktion: ad 100 µl pNPP

Substratlösung A 1 g/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Harnstoff  
 (Peroxidasepuffer) 18 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 1 H<sub>2</sub>O  
 10,3 g/l Citronensäure x 1 H<sub>2</sub>O  
 100 µl Kathon CG  
 ad 1l H<sub>2</sub>O reinst

Substratlösung B 500 mg TMB  
 (Peroxidasepuffer) 40 ml DMSO  
 10,3 g Citronensäure x 1 H<sub>2</sub>O

Schwefelsäure 800 ml H<sub>2</sub>O reinst  
 (Peroxidase Stopp) 100 ml Schwefelsäure 96%

*Puffer für präparative Methoden*

Sporenaufschlusspuffer:	20 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	2 % (w/v)	SDS
	10 % (w/v)	Glycerin
	1 %	β-Mercaptoethanol

Für nicht reduzierende Bedingungen wurde β-Mercaptoethanol weggelassen.

CHAPS-Puffer:	6 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff
	4 %	CHAPS
	65 mM	DTT
	pH 8,0	

Phosphatpuffer:	5 mM	$K_xH_xPO_4$
	150 mM	NaCl
	pH 6,8	

Natriumperjodatpuffer:	20 mM	NaPerjodat
	50 mM	NaAcetat
	pH 4,0	

**2.1.3 Kits**

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen (Hilden)

**2.1.4 Enzyme**

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
BioTherm <sup>AB</sup> Polymerase	GeneCraft (Ulm)
RNase A	Promega (Madison, USA)

### 2.1.5 Antikörper

$\alpha$ - <i>T. caries</i> (polyklonal, Kaninchen)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>T. controversa</i> (polyklonal, Kaninchen)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>U. nuda</i> (polyklonal, Kaninchen)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>U. tritici</i> (polyklonal, Kaninchen)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - Kaninchen IgG AP-Konjugat (monoklonal, Ziege)	Calbiochem (Darmstadt)
$\alpha$ - Kaninchen IgG POD-Konjugat (monoklonal, Ziege)	Calbiochem (Darmstadt)
$\alpha$ - <i>T. caries</i> (monoklonal, Maus)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>T. controversa</i> (monoklonal, Maus)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>T. indica</i> (monoklonal, Maus)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - <i>U. nuda</i> (monoklonal, Maus)	Julius Kühn-Institut (Quedlinburg)
$\alpha$ - Maus IgG AP-Konjugat (monoklonal, Ziege)	Calbiochem (Darmstadt)
$\alpha$ - Maus IgG POD-Konjugat (monoklonal, Ziege)	Calbiochem (Darmstadt)

### 2.1.6 Standards

100 kb DNA-Längenstandard	Peqlab (Erlangen)
Rotimark Prestained Marker	Peqlab (Erlangen)
Low Molecular Weight (LMW) Marker	Peqlab (Erlangen)

### 2.1.7 Proteine

Rinderserumalbumin (BSA; 100x)

New England Biolabs (Schalbach)

### 2.1.8 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH (Ulm) bezogen und falls nicht anders genannt, als Sequenzier- und/oder PCR-Primer verwendet.

Tcon1-for: 5'-TCCTCGCACGCGCCATC-3'

Tcon2-rev: 5'-GTTGACCACGGAGCTTGTTTC-3'

car\_spec2: 5'-GGCAAGCTCCTGTCCAAC-3'

con\_spec2: 5'-GATCACCACGTCGGAAGC-3'

con\_lang: 5'-CGCCGTCACAACCTCCTC-3'

ind\_spec: 5'-AGGTCTCATCGCCACA-3'

til\_univ2: 5'-GGGTCTTGACGTCGGTGAT-3'

Tcar2A: 5'-ACAACAGCAAATACGCCAAT-3'

Tcar2B: 5'-TCCCGTACTTGACATGGACC-3'

### 2.1.9 Pflanzen und Pilzmaterial

Pflanzenherkünfte:

Gerste (gesund und infiziert mit *U. nuda*):

- Helmut Mitterer, Institut für Pflanzenschutz, LfL Freising.
- Benno Voit, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, LfL Freising.



Weizen (gesund und mit anhaftenden Sporen):

- Pflanzenschutzamt Hamburg
- Benno Voit, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, LfL Freising.
- Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg.
- Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena.
- Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Münster.

Pilzherkünfte:

*Ustilago nuda* (infizierte Körner):

- Helmut Mitterer, Institut für Pflanzenschutz, LfL Freising

*Ustilago nuda* (lyophilisiert bzw. Plattenkultur; Mycel):

- Centraalbureau voor Schimmelcultures; Niederlande; Fungal Biodiversity Centre ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)); Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW); CBS 118.19.

*Ustilago hordei* (lyophilisiert; Mycel):

- Centraalbureau voor Schimmelcultures; Niederlande Fungal Biodiversity Centre ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)) Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (KNAW); CBS 123.12.

*Tilletia caries* (Sporen bzw. Butten aus infizierten Ähren):

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising, Freising.
- Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg.
- National Small Grains Germplasm Research Facility. Aberdeen, USA.
- GEVES, Station Nationale d'Essais des Semences. Cedex, Frankreich.
- Pflanzenschutzdienst Hessen, Kassel.
- Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena.
- Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Dresden.
- Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau, Sachsen-Anhalt, Bernburg.
- Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, Münster.
- Federal Biological Research Centre, Darmstadt.

*Tilletia controversa* (Sporen bzw. Butten aus infizierten Ähren):

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising, Freising.
- Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg.
- National Small Grains Germplasm Research Facility. Aberdeen, USA.

*Tilletia indica* (aus Sporenlager Infizierter Körner):

- Department of Plant Breeding, Genetics & Biotechnology; Punjab Agricultural University; Punjab, Indien.
- Dr. Monica Mezzalama, Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT), El Batan, Texcoco, Edo. de Mexico, D.F., Mexiko.

### 2.1.10 Geräte

Spannungsquellen:

LKB-GPS 200/400	Amersham Biosciences (Freiburg)
EPS 3500, 3501, 301, 600, 601 und 1001	

Thermocycler:

Mastercycler <b>ep</b> Gradient S	Eppendorf (Hamburg)
ABI Prism 7000	Applied Biosystems (Darmstadt)

Spektrophotometer:

Biotech Ultrospec 3000	Amersham Biosciences (Freiburg)
------------------------	---------------------------------

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen:

DNA-Agarosegelelektrophorese-Kammer RHU10	Roth (Karlsruhe)
Hofer Mighty Small II Gelelektrophoreseeinheit SE220-10A-75	Amersham Biosciences (Freiburg)
Sammy Dry Blot Apparatur	Schleicher & Schuell (Dassel)

Waagen:

Sartorius Universal Laborwaage 1601 004	Sartorius (Göttingen)
Sartorius Analysenwaage BP 121 S	
Sartorius Halbmikrowaage BL 310 und BL 1500S	

Mikroskope:

Lichtmikroskop:

S M - Lux	Leitz (Wetzlar)
-----------	-----------------

Elektronenmikroskop:

JSM-5900LV	Jeol (Eching)
------------	---------------

Zentrifugen:

Eppendorf-Tischzentrifuge (div. Mod.)	Eppendorf (Köln)
Heraeus Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Hettich Tischzentrifuge Micro20	Hettich (Tuttlingen)
Hettich Universal und Rotina	Hettich (Tuttlingen)
Kühlzentrifugen (div. Mod.)	

Weitere Geräte:

Autoklav-Dampfkessel (TRD) 601	MM (München)
Eismaschine ZBE350	Ziegra (Isernhagen)
Eppendorf-Thermomixer compact/comfort	Eppendorf (Hamburg)
-80 °C Gefrierschrank MDF-U6086S	Sanyo (San Diego, USA)
Magnetrührer (div. Mod.)	IKA Werke (Staufen), Heidolph (Kelheim)
Metallthermoblock TB 1	Biometra (Göttingen)
Minishaker MS2	IKA (Wilmington, USA)
Vortex Reax top	Heidolph (Kelheim)
pH-Meter Multical pH 538	WTW (Weilheim)

Schwenktisch Polymax1040	Heidolph (Kelheim)
Umluftinkubator	Memmert (Schwabach)
Vakuumpumpe	Vacuumbrand (Wertheim)
Wasserbad Haake (div.Modelle)	Haake (Karlsruhe)
Digitalkamera Canon EOS 350D	Canon (Krefeld)
UV-Leuchttisch	Spectroline (Westbury, New York)

### 2.1.11 Sonstige Materialien

Polystyrol Einmalküvetten 1,5 ml	Brand (Wertheim)
Whatman Filterpapier	Whatman (Maidstone, UK)
Immobilon-P Membran	Millipore (Bedford, USA)
Polyvinylidendifluorid (PVDF)	
Nitrocellulosemembran	Invitrogen (Karlsruhe)
Protran NCBA 85	
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner bio-one (Frickenhausen)
PE-Röhrchen (50ml und 15 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
ERG (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf (Köln), Brand (Wertheim), Greiner bio-one (Frickenhausen), Biozym (Oldendorf)
PCR Softtubes (0,2ml)	Biozym (Oldendorf), Brand (Wertheim)
Glasware	Schott Glas (Mainz)
pH-Indikatorstreifen	Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter 0,22 µm	Merck (Darmstadt),
Vivaspin Concentrator	GE Osmonics (Minnetonka, USA)
Rasierklingen	Gillette (Boston,USA)
Spritzen (div. Größen)	Brand (Wertheim)
Parafilm „M“	Brand (Wertheim)

### 2.1.12 Computerprogramme und Webtools

Adobe	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)
Acrobat Reader 8	
Photoshop 7	
Microsoft	Microsoft (Redmond, USA)
Windows XP	
Office 2007	
File Builder 3.1	Applied Biosystems (Darmstadt)
EMBL-EBI Tools und Datenbanken	<a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>
Swissprot Datenbanken	<a href="http://us.expasy.org/">http://us.expasy.org/</a>
Expasy Tools	<a href="http://us.expasy.org/tools">http://us.expasy.org/tools</a>
Signal-P	
Protparam	
ClustalW2	
NCBI-Datenbanken	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Pubmed	
BLAST	
Brookhaven Protein Datenbank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a>

## 2.2 Präparative und molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Ernte von Brandpilz befallenen Weizen- und Gersten-Ähren

Sofern befallenes Saatgut bzw. Ähren nicht von anderen Herkünften direkt bezogen wurde, wurden Ähren auf umliegenden Versuchsflächen, die mit dem entsprechenden Pathogen befallen waren, aus dem Bestand heraus geschnitten. Befallene Ähren weisen breiter abgespreizte Spelzen auf und die Halme sind in der Regel etwas verkürzt. Bei *T. controversa* sind die Halme größtenteils deutlich eingekürzt. In manchen Fällen sind auch die Brandbutten deutlich zu erkennen. Die Geschnittenen Ähren werden bis zum weiteren Gebrauch in Leinensäcken dunkel und trocken gelagert. Bei mit *U. nuda*

befallenen Ähren wurde mit Plastiktüten gearbeitet, da die dünnen Häutchen der Sporenlager leicht aufplatzen.

Wird im kleinen Maßstab gearbeitet reicht eine Butte für DNA oder Proteinarbeiten. Hierfür wird aus der Ähre eine Butte vorsichtig heraus genommen, in einem ERG zerdrückt und die Brandbuttenhülle entfernt. Die reinen Sporen können dann weiter verwendet werden.

Im großen Maßstab werden die geschnittenen Ähren durch eine Handwalze getrieben und in einer Schüttelsiebanlage von Spelzen und Bruch befreit. Die Siebanlage besteht aus mehreren übereinander gelagerten Sieben mit sich von oben nach unten reduzierenden Durchmessern. Durch automatische Vibration gelangen die Sporen langsam bis in die unterste Auffangwanne und die größeren Bestandteile wie Buttenhülle, Spelzen oder Ährenreste verbleiben in den höheren Siebschichten zurück. Die reinen Sporen sind dann bereit zur weiteren Verwendung.

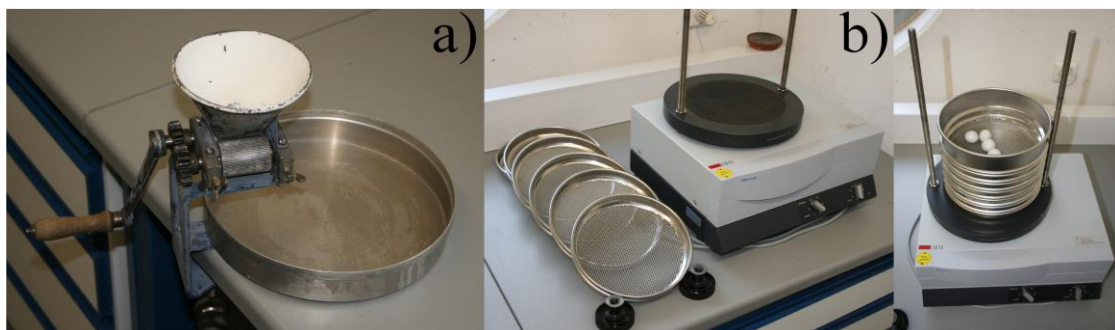


Abb. 8: Geräte zur Gewinnung reiner Sporen. a) Handwalze zum Aufbrechen der Brandbutten. b) Schüttelsiebanlage.

### 2.2.2 Isolierung und Reinigung von DNA

#### *DNA Isolierung aus Sporen*

DNA-Isolierung aus Sporen wurde mit dem *DNeasy Plant Mini Kit* von Qiagen durchgeführt. Da das Protokoll vom Hersteller keine befriedigende DNA Ausbeute gewährleisten konnte, wurde ein mechanischer Sporenaufschluss vorgeschaltet. Hierfür

wurden Sporen aus einer einzelnen Brandbutte oder 20 mg Sporen in ein ERG gegeben und mit dem 3-4 fachen Volumen an Glasperlen (0-2 mm) versetzt. Mit einem Plastikstößel wurde das Gemisch für 5 min. im ERG gemörsert und im Anschluss dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Die finale Elution wurde mit 75 µl des beigefügten Elutionspuffers durchgeführt und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Alternativ als schnelle Extraktionsmethode wurden angefeuchtete Sporen für 5 min in der Mikrowelle erhitzt und in TE Puffer aufgenommen. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand weiter verwendet. Diese Extraktionsmethode bietet einen deutlichen Zeitvorteil, hat aber den großen Nachteil, dass noch viele Störstoffe wie RNA, Proteine, Polysaccharide oder Sporenbruchstücke in der DNA-Lösung sind.

### *Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese*

Die Agarose-Gelelektrophorese erfüllt *analytische* sowie *präparative* Aufgaben. Sie dient der Qualitätskontrolle, Konzentrationsabschätzung und zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten durch eine Auftrennung nach ihrer Form und Größe. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet, wobei sich die Agarosemenge nach der Größe der gesuchten Fragmente richtet. Für die Gelherstellung wurde TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose aufgeköcht und nach Abkühlen auf 60 °C mit final 0.04 % (w/v) Ethidiumbromid versetzt. Zu den DNA Proben wurde entsprechend 6xDNA-Auftragspuffer gegeben, die Ansätze zusammen mit der 1kb-DNA-Leiter als Größenstandard auf das erstarrte Gel aufgetragen und mit 1xTAE als Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V für 30-45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Mit anschließender UV-Beleuchtung (254 nm) konnte das Gel betrachtet und ggf. mit einer Videokamera dokumentiert werden.

### *Reinigung von DNA aus Agarosegelen*

Um spezifische PCR Produkte zu isolieren, wurden diese in präparativen Agarosegelen aufgetrennt und die zu isolierenden DNA-Banden unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus den

Gelstücken erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen mit Lösungen und nach dem Protokoll des Herstellers. Die finale Elution wurde mit 30 µl nucleasefreiem H<sub>2</sub>O durchgeführt, die DNA anschließend bei -20 °C gelagert.

Sollten nach einer PCR die entstandenen Produkte sequenziert werden, wurde zur Entfernung von Enzymen und zur Entsalzung eine Reinigung der DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen durchgeführt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Elution erfolgte in 75 µl nuklease freiem H<sub>2</sub>O oder dem beigefügtem Elutionspuffer.

Die DNA Konzentration für die Sequenzierung wurde photometrisch in einer Quarküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

$OD_{260} = 1$  entspricht 50 µg/ doppelsträngiger (ds) DNA

Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 µM eingestellt und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3 PCR Methoden**

#### **2.2.3.1 Klassische PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) von Mullis (Mullis & Faloona, 1987) ist eine Methode zur schnellen und gezielten Amplifikation von Nucleinsäuren. Das Enzym DNA-Polymerase dupliziert einzelsträngige DNA (ssDNA) von ihrem freien 3'-Ende weg, indem sie diese mit den zur vorliegenden Sequenz komplementären Basen auffüllt. Als Substrate dienen die vier Desoxynucleotid-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Mit Hilfe von Oligonucleotiden, sog. Primern, die komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind, kann man von beiden Enden eines DNA-Abschnittes aus Kopien erstellen. Als präparativ amplifizierendes Enzym wurde in dieser Arbeit BioTherm<sup>AB</sup> GC-008-1000 Polymerase der Firma Gene Craft (Ulm) mit *proof-reading* Funktion verwendet.



Wenn nicht anders vermerkt, wurden die PCR-Amplifikationen in folgendem Standardansatz durchgeführt:

Template DNA aus Extraktion	3 $\mu$ l
10x Reaktionspuffer (+Mg <sup>2+</sup> )	5 $\mu$ l
DMSO	5 $\mu$ l
dNTP-Mix	1 $\mu$ l
Primer (100pmol/ $\mu$ l)	je 0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l
Polymerase (nach <i>hot start</i> )	2,5 Units

Unter Verwendung der jeweils vom Hersteller der Polymerase mitgelieferten Reaktionspuffer wurden die Reaktionen in ultradünnwandigen PCR-Tubes angesetzt.

Bei allen verwendeten DNA-Polymerasen wurde die so genannte *hot start* Methode verwendet. Hierbei wurde die DNA-Polymerase erst zugegeben, nachdem der Ansatz bereits 5 min auf 95°C erhitzt wurde. Dadurch wird die Template-DNA quantitativ denaturiert, die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte vermindert und die Ausbeute an PCR-Produkten erhöht. Die eigentliche Amplifikation wurde in 40 - 45 Wiederholungen von (i) DNA-Denaturierung, (ii) Primer-Annealing und (iii) Primer-Extension im Mastercycler ep Gradient der Firma Eppendorf (Hamburg) bei geheiztem Deckel durchgeführt. Die Einstellungen des Thermocyclers wurden je nach Primerpaar, Templatelänge und -art variiert. In der Regel wurden folgende Standardbedingungen verwendet:

Tab. 1: Standard PCR-Bedingungen für qualitative Bestimmungen.

	Phase	Dauer	Temperatur
<b>1x</b>	Hotstart	5 min	95 °C
<b>40-45x</b>	<i>i</i> ) Denaturierung	1 min	95 °C
	<i>ii</i> ) Primer-Anlagerung	15 sek	48 °C – 60 °C
	<i>iii</i> ) Primer-Extension	20 sec	72 °C
<b>1x</b>	Finale Extension	5 min	72 °C

Zum Abschluss wurden eventuell unvollständige Amplifikate in einer verlängerten Extensionsphase komplettiert. Die Lagerung bis zur Weiterbehandlung erfolgt bei 4 °C auf Eis oder Ü.N. bei -20 °C.

#### 2.2.3.2 Real Time PCR

Trotz der wesentlichen Erleichterungen in der täglichen Laborarbeit, die die verhältnismäßig leicht zu automatisierende Methode der PCR mit sich gebracht hat, bedeutet der sensitive, reproduzierbare und spezifische Nachweis der PCR-Produkte noch immer einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand. Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen und nicht nur qualitative sondern auch quantitative Aussagen zu ermöglichen, wurde ein so genannter homogener Assay entwickelt, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß möglich sind. Dies gelang erstmals 1993 durch die Weiterentwicklung des 1991 von Holland *et al.* beschriebenen 5'-Nuclease PCR-Assays unter Ausnutzung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase und Einbeziehung von fluorogenen Sonden zur Detektion der Amplifikation (Lee *et al.* 1993). Die fluorogenen Sonden dieses so genannten TaqMan™ PCR-Systems sind am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Der Quencher-Farbstoff nimmt zunächst über einen Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz- Energie-Transfer (FRET) die Emissionsenergie des Reporter-Farbstoffs auf und unterdrückt damit dessen Fluoreszenz. Während der PCR hybridisiert die Sonde zusammen mit den Primern an den Amplifikaten und in der Extensionsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA-Polymerase hydrolysiert. Dadurch werden die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt die Fluoreszenz durch freie Reportermoleküle mit jedem PCR-Zyklus an und kann mit einem geeigneten Detektionssystem während der Amplifikation gemessen werden. Für das Nachweissystem mit Hybridisierungssonden sind zwei fluoreszenzmarkierte Sonden notwendig, die zusammen mit den Primern an die Amplifikate hybridisieren und dadurch in räumliche Nähe gebracht werden. Nach Anregung des so genannten Donator-Farbstoffes der einen Sonde mit Licht einer

bestimmten Wellenlänge kann diese Energie über einen FRET auf den Reporter-Farbstoff der anderen Sonde übertragen werden. Der Reporter-Farbstoff emittiert dann die übertragene Energie als Licht einer bestimmten Wellenlänge, die zur Online-Verfolgung der Amplifikation gemessen wird.

In dieser Arbeit wurde mit TaqMan Sonden mit MGB (Minor Groove Binder) der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) gearbeitet, die TAMRA<sup>TM</sup> (Quencher) und FAM<sup>TM</sup> (Reporter) gelabelt sind. Um die Präzision der Gesamtreaktion zu erhöhen befindet sich im Real Time Master Mix eine passive Referenz mit dem Farbstoff ROX<sup>TM</sup>, mit dessen Fluoreszenzwerten die eigentlichen Messwerte „normalisiert“ werden. Dies verhindert eine zu hohe Streuung aufgrund von Pipettierungenauigkeiten und verbessert so die Ergebnisse.

Die Real Time PCR-Amplifikationen in folgendem 20 µl Standardansatz durchgeführt:

TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR	10 µl
Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup>	
UNG (2x)	
20x Assay Mix (Sonden)	1 µl
DNA	9 µl

Polymerase ist im Master Mix bereits enthalten.

Als Standardbedingung für die Realtime PCR wurde zunächst initial 2 min bei 50°C UNG aktiviert, dann 10 min bei 95°C die DNA denaturiert. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit jeweils 15 sec 95°C und 1 min 60°C.

Viele kommerziell erhältliche Kits enthalten neben den üblichen dNTPs auch dUTP und das Enzym Uracil-N-Glycosylase (UNG) aus *E. coli*. Das Enzym hydrolysiert die uracil-glycosidischen Bindungen in ssDNA und dsDNA, ist jedoch inaktiv gegenüber RNA und uracil-freier DNA. Durch den Zusatz von dUTP anstelle von dTTP wird während der Reaktion dUTP in die neu synthetisierten Amplifikate eingebaut. Vor jedem neuen Versuch werden kontaminierende, uracil-haltige PCR-Produkte der vorangegangenen PCR-Reaktion durch die UNG während eines zusätzlichen

Inkubationsschrittes degradiert. Die uracilhaltigen PCR-Produkte können somit nicht mehr als Template für die aktuelle Reaktion dienen. Im Zuge der neuen PCR-Reaktion wird die UNG durch die hohen Denaturierungstemperaturen inaktiviert, so dass die neu entstehenden Produkte nicht degradiert werden.

#### **2.2.4 Proteinextraktion aus Sporen und Gerstenkörnern**

Für die Proteinextraktion aus Sporen wurde wie bei der DNA-Extraktion ein mechanischer Aufschluss vorgeschaltet, um die dickwandige Sporenhülle aufzubrechen. Hierzu wurde der Inhalt einer ganzen Butte bzw. 20 mg reine Sporen in ein ERG gegeben und mit der 3-4fachen Menge an Glasperlen (0-2mm) vermengt und mit einem kleinen Stößel für 5 min gemörsert.

Für Analysen im SDS-Gel wurden die gemörserten Sporen mit 500 µl Lämmli-Puffer überschichtet und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 14.000 rpg) konnte der Überstand weiter verwendet werden.

Für ELISA Untersuchungen bei Gerste wurde die Halbkorn-Technik verwendet. Hierbei wurde das Gerstenkorn halbiert und die Embryohälfte zunächst gequetscht und in eine Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend mit 200 µl CHAPS-Puffer überschichtet und für 30 min bei 40°C inkubiert. Bei einer längeren Inkubationszeit quillt das Korn zu sehr auf und verringert die Proteinhaltige Flüssigkeitsmenge wesentlich. 100 µl des Überstands einer jeden Kavität wurden im weiteren Schritt zum Coaten verwendet.

#### **2.2.5 Gewinnung der Antikörper**

Zur Gewinnung von polyklonalem Antiserum wurden Kaninchen direkt mit *Tilletia* - Sporensuspension als Antigen immunisiert. Zur Gewinnung von monoklonalem Antiserum wurden für *Tilletia* entwickelte spezifische syntetische Peptide verwendet und Mäuse damit immunisiert.

Als Antigen zur Gewinnung von monoklonalem Antiserum wurde für *Ustilago nuda* eine Suspension aus Kulturüberstand von Plattenmycel-Kulturen verwendet und Mäusen injiziert. Ein polyklonales Antikörperserum gegen *U. nuda* lag bereits vor.

Die weiteren Schritte bis zum aufgereinigten Antikörper wurden von Dr. Frank Rabenstein vom Julius Kühn-Institut, Quedlinburg durchgeführt.

## **2.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird die Wanderung geladener Biomoleküle im elektrischen Feld ausgenutzt, um eine analytische Trennung nach der Größe zu erzielen. Die Trennung beruht dabei auf einer molekülcharakteristischen Bewegung durch eine Polyacrylamid-Matrix. Polyacrylamidgele entstehen durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer, wobei TEMED als Radikalstarter, und APS als Radikalstabilisator dienen.

Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt im Spannungsfeld auf Grund des Wanderverhaltens von denaturiertem und geladenem Protein im dreidimensionalen Netzwerk des Gels, dessen Porengröße durch die Totalacrylamidkonzentration und dem Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt wird. In einem SDS-Gel ist die durch Elektrophorese bedingte Wanderungsgeschwindigkeit eines denaturierten Proteins proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts. Das im Auftragspuffer enthaltene anionische Detergens SDS, welches sich im Gewichtsverhältnis von 1:1,4 (SDS:Aminosäure) an das Protein anlagert, verleiht diesem eine negative Überschussladung von etwa 1 pro 2 Aminosäurereste. Thermische Denaturierung für 5 min bei 94°C sorgt durch Entfaltung und SDS-unterstützte Linearisierung des Proteins für ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis, zumal die relativ geringe intrinsische Ladung des Proteins maskiert wird (Laemmli, 1970).

Um das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden abschätzen zu können, wurde ein Molekulargewichtsstandard auf die Gele aufgetragen, LMW Marker bei Gelen die

gefärbt wurden und Rotimark vorgefärbte Marker für ein anschließendes Immunoblotting (siehe: 2.4.4). Für diese Arbeit wurden nur 12.5 % ige Trenngele (TG) und 3 % ige Sammelgele (SG) benutzt (modifizierte Methode nach Fling (Fling & Gregerson, 1986)). Die Elektrophorese dauerte 45-60 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel in 1x Laufpuffer (für SDS PAGE). Beendet wurde sie, sobald die Farbfront aus dem Gel heraus gelaufen ist. Für eine Gelgröße von 8.5 x 6.5 x 0.075 cm wurden für 2 Gele die folgenden Gellösungen verwendet (Laemmli, 1970):

Tab. 2: Gellösungen für SDS-Polyacrylamidgele

	<b>TG (12.5 %)</b>	<b>SG (3 %)</b>
40 % Acrylamid (38:2)	3,125 ml	0,625 ml
4 x TG-Puffer	2,5 ml	-
2 x SG-Puffer	-	2.5 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	4,175 ml	1,775 ml
<b>Σ</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>
10 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Bei den in dieser Arbeit abgebildeten Gelen ist die Größe von Markerbanden in Kilodalton angegeben.

### 2.3.2 Färbung der SDS-Gele nach Fairbanks und Coomassie

Bei dieser Färbemethode werden die SDS-Polyacrylamidgele in drei Lösungen A, B und C; welche den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue in absteigender Konzentration enthalten, inkubiert. Das in den Lösungen A und B enthaltene Isopropanol öffnet die Poren des Gels, um das Eindringen des Farbstoffes, jedoch ohne Diffusion des Proteins, zu erleichtern. Anschließend wird ungebundener Farbstoff mit einer Essiglösung D entfernt. Durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle konnten die Inkubationszeiten, abweichend von der Originalvorschrift, auf je ca. 10 min verkürzt werden.

*Färbe- und Entfärbelösungen:*

- Lösung A: 25 % (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) techn. Eisessig;  
0,05 % (w/v) Coomassie Blau R
- Lösung B: 10 % (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) techn. Eisessig;  
0,005 % (w/v) Coomassie Blau R
- Lösung C: 10 % (v/v) techn. Eisessig; 0,002% (w/v) Coomassie Blau R
- Lösung D: 10 % (v/v) techn. Eisessig

Durch Weglassen der Lösungen B und C konnte die Gelfärbung noch einmal verkürzt werden. Die Qualität der Färbung wurde hierbei nur unwesentlich herabgesetzt.

Bei der Coomassie-Färbung wird das Gel aus der SDS-PAGE in Färbelösung über Nacht eingelegt und anschließend mit Leitungswasser unter Schütteln so lange entfärbt, bis ein zufriedenstellender Kontrast erreicht wurde.

*Färbe- und Entfärbelösung:*

- Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Blau R-250  
40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: Leitungswasser

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die gefärbten Gele in 3% Glycerinlösung eingelegt und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien, die auf eine Glasplatte gespannt sind, an Luft getrocknet.

### **2.3.3 Elektroelution von Proteinen aus SDS-Gelen**

Zur Isolierung von Proteinen aus präparativen Polyacrylamidgelen wurden die entsprechenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelscheiben zerkleinert. Die Elektroelution der Proteine erfolgte mit der Biotrap BT 1000 (Schleicher & Schüll, Dassel) über Nacht bei 200 V in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 nach Angaben des Herstellers. Die Proteinlösung wurde mittels Vivaspin Konzentratoren aufkonzentriert und in einer Konzentration von 500 µg/ml als Antigen zur Antikörpergewinnung eingesetzt.

### 2.3.4 Immunoblotting (Western Blot)

Im Westernblot nützt man die sehr spezifische Wechselwirkung zwischen Antikörper und seinem Antigen aus, um Proteine nachzuweisen (Towbin *et al.*, 1979). Für den Nachweis spezifischer Proteine von *Tilletia caries*, *T. controversa*, *T. indica* und *Ustilago nuda* wurde jeweils als spezifischer, primärer Antikörper ein polyklonales Antikörperserum aus Kaninchen gegen Oberflächen Antigene der Sporen verwendet. Alle primären Antikörper wurden durch das Julius Kühn Institut (Quedlinburg) hergestellt. Als sekundärer Antikörper diente Peroxidase oder alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege der Firma Calbiochem.

Der Blot wurde in einer Sammi-Dry-Apparatur durchgeführt (Khyse-Anderson, 1984). Für den Transfervorgang wurde ein Stapel aus 3 x Whatman-Filterpapier, PVDF bzw. Nitrocellulose Membran, SDS-PAGE-Gel und 3 x Whatman-Filterpapier in die Blot-Apparatur von unten nach oben eingelegt. Alle Komponenten wurden vorher 10 min in WB-Transferpuffer eingelegt. Die Membran wurde für 2 min in 100 % MeOH p.a. inkubiert und anschließend sehr gut mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen (3x schwenken, ca. 15 min). Anschließend wurde für 30 min in Inkubationspuffer inkubiert. Die Übertragung erfolgte dann 1,5 h bei ca. 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel (72 mA je Gel). Zur Kontrolle des Blots diente der vorgefärbte Molekulargewichtsstandard *Rotimark Prestained* von Peqlab, der auch zur Abschätzung des Molekulargewichts der geblotteten Proteine verwendet wurde.

Nach dem Absättigen freier Oberflächenvalenzen mit Milchpulver, wurde die Membran mit dem primären, spezifischen Antikörper 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS 0,1% TWEEN für je 5 min wurde der primäre Antikörper mit dem sekundären markiert. Nach einstündigem Einwirken des sekundären Antikörpers wurden freie, ungebundene Partikel durch 3 maliges Waschen mit PBS 0,1 % TWEEN für jeweils 5 min und 3 maliges Waschen mit PBS gewaschen. Der verwendete sekundäre Antikörper, Alkalische Phosphatase konjugiertes  $\alpha$ -Hase-IgG aus Ziegen, katalysiert mit NBT und BCIP die Farbreaktion auf der Membran.



### 2.3.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis von infizierten Gerstenkörnern einer Probe wurde der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Mit dieser Technik können infizierte Gerstenkörner quantitativ bestimmt werden. Zunächst wurden 100 µl des isolierten Gesamtproteins aus der Embryohälfte eines Gerstenkorns (vgl. 2.2.4) in eine Kavität einer Mikrotiterplatte (Ausführung „U96 Maxisorp) der Firma Nunc (Wiesbaden) pipettiert (coaten). Nach Inkubation für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht wird die Platte 3-mal mit dem ELISA-Washer Hydro Flex der Firma Tecan (Crailsheim) gewaschen. Freie Bindungsstellen der Kavitäten werden für 1h mit je 200 µl 0,2 % BSA Lösung geblockt und anschließend wieder 3-mal gewaschen. Für eine weitere Stunde wird mit 50 µl in PBS 0,5 % Tween verdünnten Erstantikörper inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen wird für eine Stunde mit 50 µl in PBS 0,5 Tween verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper ist Peroxidase (POD) konjugiert, welche die Farbreaktion des TMB im Puffer katalysiert. Nach 3-maligem Waschen und trocken klopfen der Mikrotiterplatte werden je Kavität 150 µl des Peroxidasepuffers (je 1 Teil Lösung A und Lösung B frisch gemischt!) zugegeben und die Farbreaktion nach 30 min durch Zugabe von jeweils 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Platte anschließend im Photometer bei 405 nm gemessen.

Die besten Ergebnisse wurden mit einer 1 zu 1000 Verdünnung des Erstantikörpers und einer 1 zu 2000 Verdünnung des Zweitantikörpers erreicht.

## 2.4 Mikroskopische Methoden

### 2.4.1 Lichtmikroskopie

Für die Auszählung der Sporen wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar) verwendet. Die Auszählung und Unterscheidung von *Tilletia* Arten wurde nach der Arbeitsvorschrift aus dem ISTA Handbook on Seed Health Testing, working sheet No 53 durchgeführt. Hierbei wurde nur auf die Hämocytometer- Methode zurück gegriffen, die leicht abgewandelt wurde. Anstatt eines Hämocytometers (Thomakammer) wurde eine Membran mit 144



Abb. 9: Cellulose-Membran zur Auszählung von Sporen unter dem Mikroskop

vorgezeichneten Kästchen verwendet (vgl. Abb. 9). Bei dieser Methode werden zunächst 300 Körner einer Probe abgezählt und in einem Becherglas mit 50ml Wasser + 0,1 % TWEEN gegeben und für 10 min gerührt. Vom Überstand werden 5ml abgenommen und in eine Saugfilteranlage gegeben (vgl. Abb. 10). Mittels einer Wasserstrahlpumpe wird der Überstand durch eine Membran gezogen und auf der Membran verbleiben die abgewaschenen festen Bestandteile incl. der möglicherweise in der Probe vorhandenen Sporen. Unter dem Mikroskop werden 5 zufällige Kästchen untersucht und die Art und Anzahl der Sporen bestimmt. Für die Gesamtzahl an Sporen pro Korn wird folgende Formel angewendet:

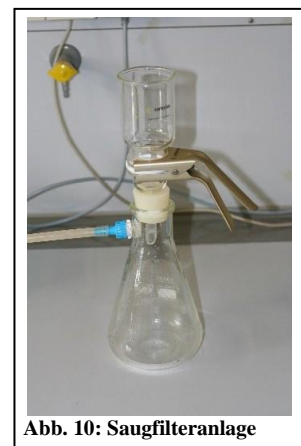


Abb. 10: Saugfilteranlage

$$x = \frac{\text{Anzahl Sporen in 5 Kästchen} \cdot 144 \text{ Kästchen}}{5 \cdot 300}$$

Die Anzahl an Sporen pro Korn ist wichtig, da für *Tilletia caries* in Kooperation mit den Ökoverbänden in Bayern ein Schwellenwert von 20 Sporen/Korn für die Anbauwürdigkeit von Saatgut im Ökolandbau vereinbart wurde. Denn erst mit der möglichen Aussage über die Befallshöhe – sprich Anzahl an Sporen pro Korn – kann eine sichere Entscheidung darüber getroffen werden, ob die entsprechenden Saatgutpartien noch anbauwürdig sind oder das Getreide noch als Futtermittel Verwendung finden kann. Für *Tilletia controversa* existiert im Augenblick noch kein Grenzwert.

Die Auszählung und Bestimmung von *Ustilago nuda* wurde nach der Arbeitsvorschrift aus dem ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 48 durchgeführt.



Abb. 11: Fenwick Can

Bei der sogenannten Embryomethode werden zunächst 2000 trockene Gerstenkörner für 22-24h in 11 5%ige NaOH Lösung und 0,2 g Trypan Blau bei 20°C inkubiert. Diese Prozedur trennt die Embryonen vom restlichen Korn. Mittels eines „Fenwick can“ (vgl. Abb. 11) können die Embryonen von den abgetrennten Bestandteilen isoliert werden, indem in einem Warmwasserfluss

von unten nach oben durch ein Sieb mit 1mm Maschenweite alle Embryonen passieren und in einem Auffangbehälter zurück gewonnen werden können. Größere Bestandteile werden durch das Sieb zurück gehalten. Um kleinere Bruchstücke und Spelzenbestandteile noch abzutrennen verwendet man ein Gemisch aus 1 zu 1 Lacto



Abb. 12: Trichterglas zum Abtrennen von Spelzen und Bruchstücken vom Embryo.

Phenol (je 1 Teil Glycerol, Phenol und Milchsäure) und Wasser in einem Trichterglas (vgl. Abb. 12). Die Embryonen sammeln sich an der Phasengrenze an, alle anderen Bestandteile sinken in die phenolische Phase herab. Durch mehrmaliges Durchmischen und Ablassen eines Teils der phenolischen Phase mit den Bruchstücken und Spelzen kann die Reinheit der Embryonen erhöht werden. Die so aufgereinigten Embryonen werden im Anschluss in frischer Glycerollösung unter dem Mikroskop untersucht. Mit *Ustilago nuda* befallene Embryonen zeigen einen bräunlich/blau gefärbten Einschluss an Pilzmycel. Das im ersten Schritt beigefügte Trypan Blau färbt nur das Pilzmycel ein und erleichtert das Erkennen von befallenen Embryonen.

Der Grenzwert für eine Zulassung als Saatgut liegt bei 0,1% in 2000 untersuchten Körnern, was 2 befallenen Embryonen entspricht. Ein höherer Befall wird das Saatgut nicht für den Verkehr freigegeben.

## 2.4.2 Raster-Elektronenmikroskopie

Ein Raster-Elektronen Mikroskop (REM) erzeugt Oberflächenabbildungen so wie sie auch von unseren Augen wahr genommen werden. Durch einen Elektronenstrahl der Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über die Oberfläche einer Probe geführt wird entsteht ein Bild. Eine große Bedeutung kommt dabei der im Vergleich zur Lichtoptik bedeutend besseren Schärfentiefe zu. Theoretisch sind mit einem REM Vergrößerungen bis zu 500000-fach und mehr möglich. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop wo durch physikalische Gegebenheiten eine Vergrößerung auf 2000-fach begrenzt ist.

Die wichtigsten Bestandteile eines REMs sind eine Elektronenquelle zur Erzeugung der Elektronen sowie magnetische „Linsen“, die den Elektronenstrahl auf das Objekt fokussieren und ein Detektor. Das Objekt muss sich im Hochvakuum befinden, da die Elektronen von den Luftmolekülen gestreut werden würden. Schließlich wird noch eine Vorrichtung zur Auswertung der mit den Elektronen abgetasteten Bilder benötigt. Das REM tasten wie der Name ankündigt, die Probe rasterförmig ab. Hierbei wird ein gebündelter Elektronenstrahl wie in einer Braun'schen Röhre über die Probe geführt, bis diese vollständig erfasst wurde. Die auftreffenden Elektronen können direkt von der Oberfläche gestreut werden oder die Emission (Abstrahlung) von Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche bewirken. Ein auf den Detektor treffendes Elektron wird durch ein elektrisches Feld beschleunigt und trifft auf einen Leuchtstoff, den es zum Leuchten anregt. Ein Photomultiplier zählt die so aufflackernden Lichtblitze.

Jeder abgetastete Punkt der Probe entspricht einem Pixel auf dem Fernsehbildschirm. Je mehr Elektronen der Zähler feststellt, umso heller wird der Pixel auf dem Bildschirm. So lassen sich für jeden Punkt die Neigung und teilweise auch das Material der Oberfläche als Helldunkelwert erfassen.

Rasterelektronenmikroskope erreichen eine um den Faktor 100 bessere Auflösung als Lichtmikroskope und haben den Vorteil, die Oberflächen eines Gegenstandes realistisch und dreidimensional darzustellen.

Objektvorbereitung:

Geringe Sporenmengen werden auf dem EM-Objektträger gegeben, mit Leitsilber fixiert (aufträufeln) und unter Vakuum getrocknet. Der Objektträger samt Probe wird im Anschluss mit verteiltem Goldstaub bedampft (sputtered), um die Oberflächen mit Elektronen im EM sichtbar zu machen. Die Betrachtung und Dokumentation der Präparate erfolgte anschließend im Rasterelektronenmikroskop JSM-5900LV von der Firma Jeol (Eching) und der mitgelieferten Gerätesoftware.

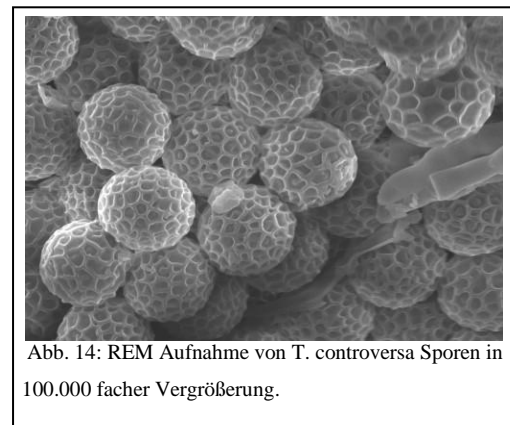
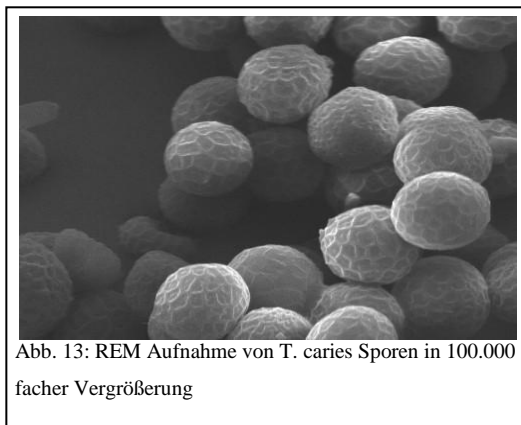
Die jeweils benutzten Vergrößerungen wurden als Maßstab angegeben.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Nachweis der *Tilletia* Arten ist seit jeher eine Herausforderung. Die klassischen mikroskopischen Methoden haben sich als recht effizient herausgestellt, weisen aber auch wesentliche Hürden auf. Für den Nachweis der *Tilletia* Arten ist sehr viel Erfahrung notwendig und eine Unterscheidung nicht immer zweifelsfrei möglich. Die Merkmale beziehen sich auf Leistenhöhe, Leistenfrequenz, Farbe und Corona der Sporen (vgl. Abb. 13 und 14).

Nur die wenigsten Sporen weisen solche Charakteristika auf, so dass sie eindeutig einer Art zugeordnet werden können. Am einfachsten funktioniert dies noch mit Sporen aus einer Brandbutte, die weder höherer Sonneneinstrahlung, größerer Wasserverdunstung und Scherkräften im Boden ausgesetzt waren. Je älter die Sporen sind und umso länger sie Umwelteinflüssen sowie Bearbeitung im Boden ausgesetzt waren, desto häufiger verschwimmen diese Merkmale. Nur sehr geübte Analysten sind dann noch annähernd in der Lage eine Unterscheidung durchzuführen. Aufgrund dieser Problematik hat bereits Stockwell 1986 eine alternative Methode entwickelt. Sie basiert auf Farbunterschiede der Sporen und/oder der Leisten, sichtbare Globuli unter dem Fluoreszenzmikroskop oder Formveränderungen. Bis heute hat sich diese Methode allerdings nicht durchgesetzt. Einige Arbeitsgruppen arbeiten wieder mit dieser Methode und beschreiben einige Probleme beim Nachweis und v.a. bei der Unterscheidung älterer Sporen sowie bei internationalen Herkünften (Schwab 2007, persönliche Mitteilung). Zudem ist ein Fluoreszenzmikroskop in der Anschaffung sehr teuer.

Um sich ein exaktes Bild der Sporen zu Verschaffen wurden rasterelektronische Aufnahmen der zu bearbeitenden Pathogene gemacht. Somit können die einzelnen Unterscheidungsmerkmale für lichtmikroskopische Bestimmungen besser hervorgehoben werden. *T. caries* Sporen haben einen Durchmesser von 14-18 µm und sind etwas kleiner als *T. controversa* Sporen mit einem Durchmesser von 18-24 µm. Die Leistenfrequenz auf der Oberfläche sowie die Leistenhöhe sind bei *T. caries* niedriger ausgeprägt als bei *T. controversa*.



Mit zunehmender Kenntnis und Verwendung von Nukleinsäuretechniken wurden diese auch vermehrt zur Diagnose von Krankheiten eingesetzt (Miller und Martin, 1988). Die meisten Arbeiten behandeln den Nachweis und die Abgrenzung des Quarantäneschädling *T. indica* von anderen *Tilletia*-Arten basierend auf Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequenzen (Levy *et al.*, 2001). *T. caries* und *T. controversa* konnten basierend auf ITS-Sequenzen nachgewiesen aber nicht unterschieden werden (Smith *et al.* 1996; McDonald *et al.* 1999; Eibel 2002). Teile der *Tilletia* ITS-Sequenzen sind in der ncbi-Datenbank veröffentlicht und sind zu 99,6 % identisch.

```

car          CATG TTCAGCTCCCAGCCTTTTGGAAAGAGAAGGTTGCTTGGAGTTGGTGATGGACGTTT 60
con          CATG TTCAGCTCCCAGCCTTTTGGAAAGAGAAGGTTGCTTGGAGTTGGTGATGGACGTTT 60
*****

car          TTTGCCAGACCTTACCGTCTTGCTCGTCTTAAATCGATCAGTGAATCATCTTTGAGCC 120
con          TT-GCCAGACCTTACCGTCTTGCTCGTCTTAAATCGATCAGTGAATCATCTTTGAGTC 119
** *****

car          CGGTCTGACTATGTGTGATAATTTGATCACATAGAATGTGGGCTTGCCCTACAACCGCAT 180
con          CGGTCTGACTATGTGTGATAATTTGATCACATAGAATGTGGGCTTGCCCTACAACCGCAT 179
*****

car          CTTGAAGGACTCTGCTTCCAACACGGAAATGGTCTTGGACCATCGTTAGCCTTTTAATGC 240
con          CTTGAAGGACTCTGCTTCCAACACGGAAATGGTCTTGGACCATCGTTAGCCTTTTAATGC 239
*****
    
```

Abb. 15: ITS-Sequenzvergleich von *T. caries* (car) und *T. controversa* (con) mittels ClustalW2. Rote Sterne zeigen eine Homologie für beide Sequenzen an derselben Position.

Die allgemeine Beurteilung zur Praktikabilität solcher Methoden fällt unterschiedlich aus. Die Meinungen reichen von kostenintensiv und unhandlich (Hollomon, 1998) bis hin zu sensitiv und verlässlich, so dass alle Ansprüche an eine diagnostische Technik erfüllt sind (Foster *et al.* 1993; Goulter und Randles 1997; Edel 1998).

Aber auch serologische Methoden finden Anwendung. 1977 wurde der ELISA in der Pflanzenpathologie von Clark und Adams zunächst zur Diagnose von Viruserkrankungen eingeführt. Kurze Zeit später von Casper und Mendgen, (1979) bereits zum Nachweis pilzlicher Erreger in Pflanzen, im Boden und schließlich in Saatgut verwendet.

### 3.1 *Tilletia*-Nachweis mit polyklonalen Antiseren

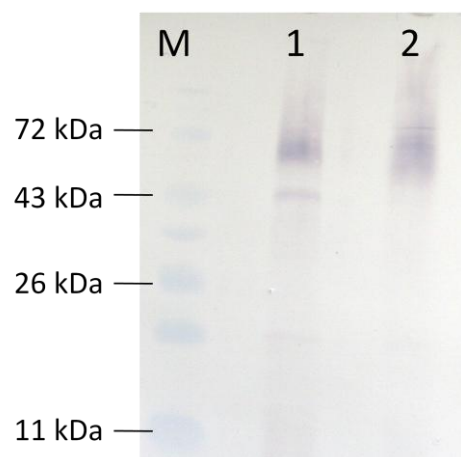
#### 3.1.1 Western Blot

Polyklonale Antikörper wurden unter Verwendung von *T. caries*- und *T. controversa*-Sporensuspension als Antigen hergestellt. Die affinitätsgereinigten Antikörper konnten für Western Blot-Analysen in einer Verdünnung von 1 : 1000 verwendet werden. Der Nachweis erfolgte anschließend über einen an alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärkörper aus Ziege ( $\alpha$ -Rabbit IgG AP-conjugate) in einer 1 : 2000 Verdünnung.

##### 3.1.1.1 *Tilletia caries*

Der *T. caries*-Antikörper zeigt im Western Blot eine einzelne spezifische Bande bei ca. 43 kDa (vgl. Abb. 16). Wechselwirkungen mit *T. controversa* zeigen sich ebenfalls, allerdings nicht im Bereich der 43 kDa Proteins.

Abb. 16: Western Blot nach SDS-PAGE mit polyklonalem *T. caries*-Antiserum gegen Gesamtproteinextrakt aus 1) *T. caries* und 2) *T. controversa*. M = Marker.

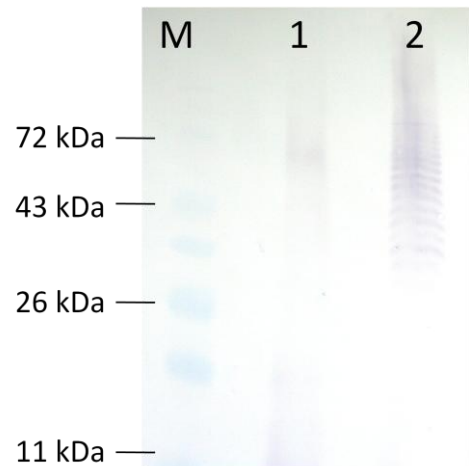




### 3.1.1.2 *Tilletia controversa*

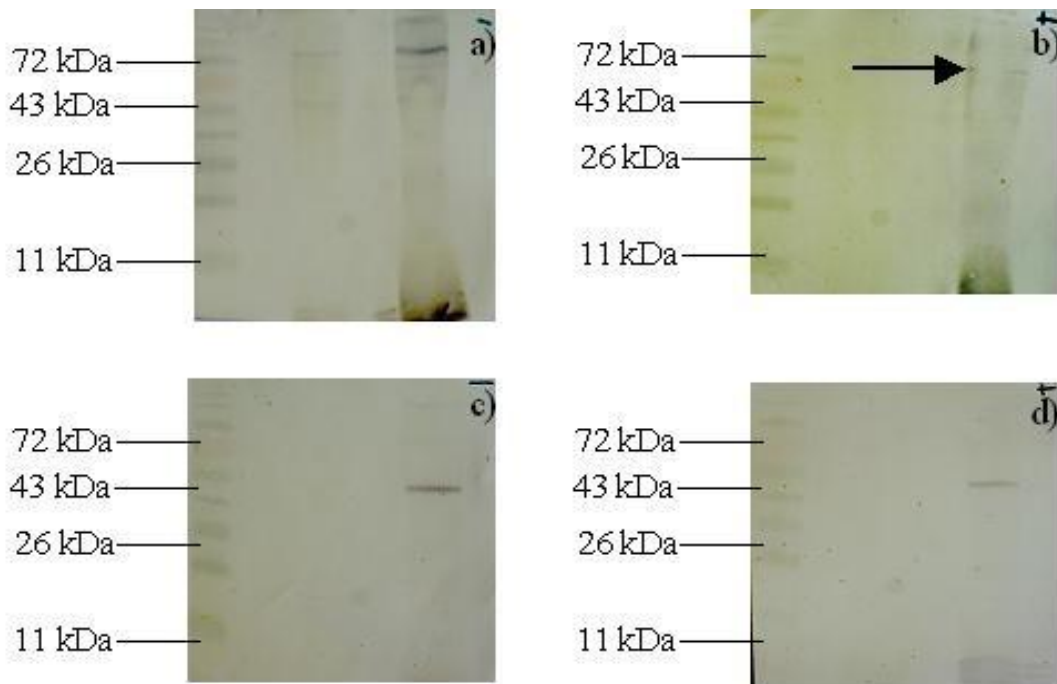
Im Vergleich dazu zeigt der *T. controversa*-Antikörper eine Vielzahl an Banden in einem "Zebrastreifenmuster" (vgl. Abb. 17), was für die Detektion von Glycopeptiden spricht (Woodward *et al.* 1985).

Abb. 16: Western Blot nach SDS-PAGE mit polyklonalem *T. controversa*-Antiserum gegen Gesamtproteinextrakt aus 1) *T. caries* und 2) *T. controversa*. M = Marker.



### 3.1.2 Natriumperjodat-Behandlung nach Woodward *et al.* (1985)

Hierfür wurde die Membran nach dem Blotten für 1h in Natriumperjodat Puffer inkubiert. Als Ergebnis resultiert eine einzelne spezifische Bande bei ca. 70 kDa (Abb. 18 b, Pfeil), welche nicht der Bande in Abb 18 a (ca. 75 kDa) entspricht. Auf den *T. caries* Antikörper hat diese Behandlung keinen Einfluss (vgl. Abb. 18 c+d).



**Abb. 18 a+b:** Western Blot nach SDS-PAGE des Gesamtproteinextrakts aus *T. controversa* mit einer spezifischen Bande bei ca. 70 kDa (Pfeil) vor und nach Natriumperjodat Behandlung.

**c+d:** Western Blot nach SDS-PAGE des Gesamtproteinextrakts aus *T. caries* mit einer spezifischen Bande bei ca. 43 kDa. Eine Natriumperjodat-Behandlung hatte hier keinen Einfluss.

### 3.1.3 Nachweisgrenze

Ebenso wie später für die PCR-Methode wurde auch hier eine Nachweisgrenze für spätere quantitative Aussagen definiert. Eingesetzt wurde eine Verdünnungsreihe von

100 mg bis 1 ng (vgl. Abb. 19). Der Antikörper erkennt im Western Blot noch Sporenmengen von 1  $\mu\text{g}$ , was ca. 500 Sporen entspricht. Wird diese Menge wiederum auf 300 Körner bezogen, ergibt sich ein minimal nachweisbarer Befall von unter 2 Sporen pro Korn.

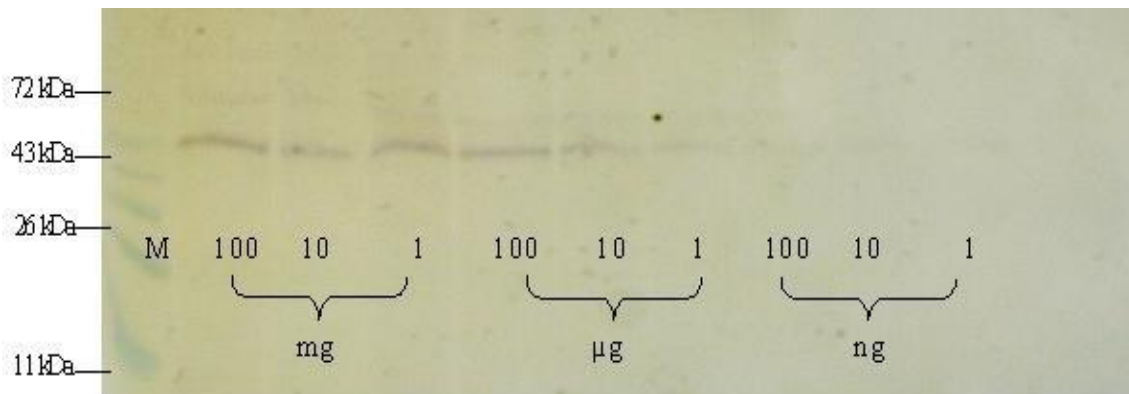


Abb. 19: Nachweisgrenze des polyklonalen *T. caries*-Antikörper bezogen auf eine Verdünnungsreihe von 100 mg bis 1 ng Sporen. M = Marker.

Die beiden polyklonalen *Tilletia*-Antiseren stellen ein sehr sensibles Mittel zum Nachweis mittels Western Blot dar. Eine Probe aus 300 Körnern kann in 5-6 h komplett analysiert und Aussagen getroffen werden, ob die Probe mit *T. caries* und/oder *T. controversa* infiziert war. In wie weit das Saatgut, aus dem die Probe stammte, für den Verkehr frei gegeben werden kann, ist mangels Quantifizierung mit dem Western Blot nicht möglich. Eine Abschätzung anhand der Bandenintensität wäre möglich, stellt aber eine zu ungenaue Methode dar.

Eine Quantifizierung ist erst unter Verwendung des ELISAs möglich. Die Sensitivität der Antikörper reicht aus, um Sporenmengen von deutlich unter 20 Sporen pro Korn detektieren zu können. Aussagen können dann hinsichtlich exakter Sporenmengen getroffen und auch noch Proben für den Verkehr frei gegeben werden, die einen Befall unterhalb des Schwellenwerts aufweisen.

### 3.1.4 ELISA

Als zweite Nachweismethode wurde der ELISA verwendet und Sporen bzw. Sporenprotein in einer Verdünnungsreihe in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gecoatet. Der Erstantikörper wurde ebenfalls in einer Verdünnungsreihe angewendet.

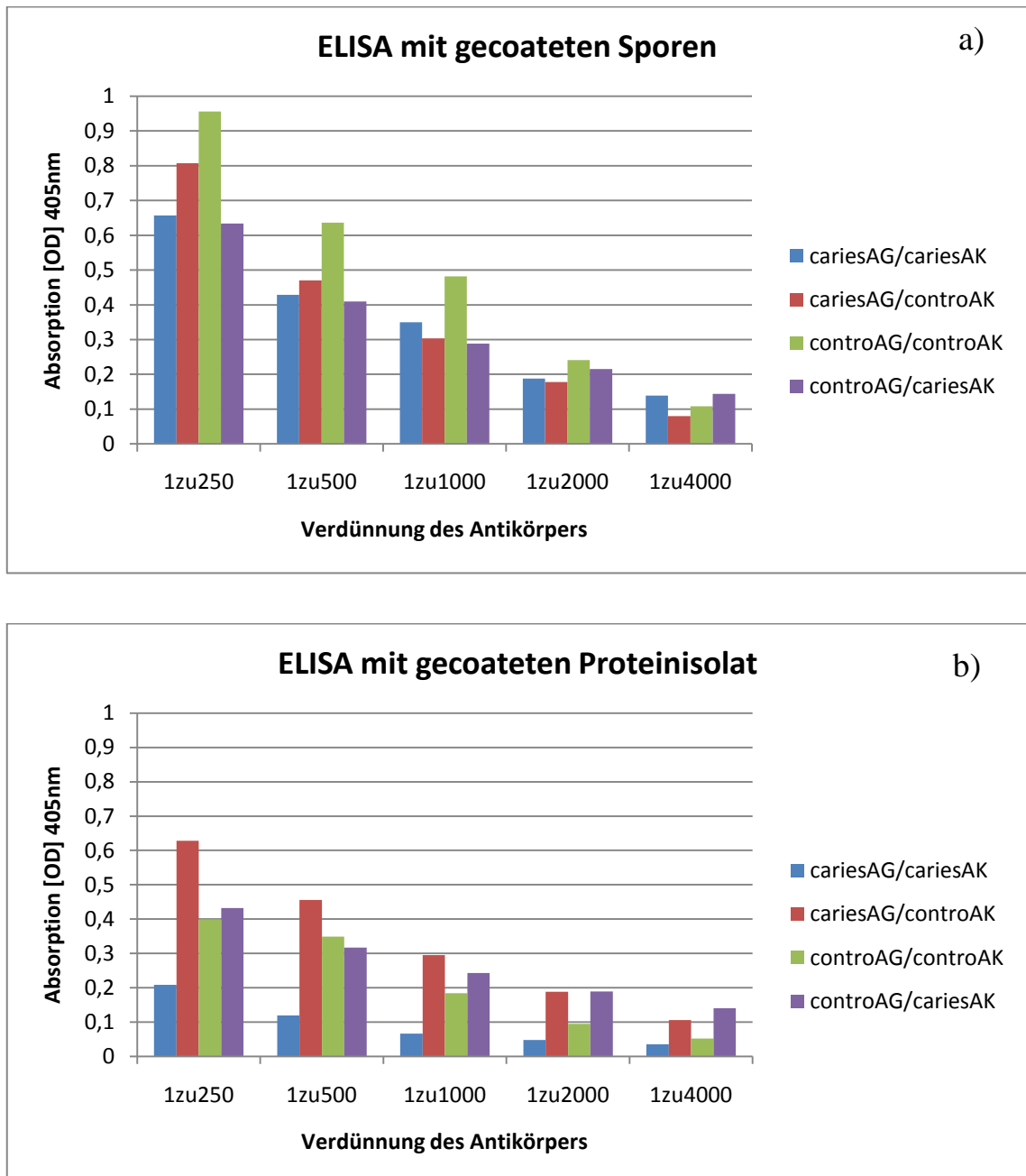


Abb. 20 a + b: Absorptionswerte gecoateter Sporen bzw. Gesamtproteinextrakt im ELISA unter Verwendung der polyklonalen *T. caries*- und *T. controversa*-Antikörper.

Für beide Coatingmethoden (Sporen direkt oder extrahiertes Gesamtprotein) zeigt sich keine Spezifität im ELISA. Die hohen Wechselwirkungen untereinander, die bereits im Western Blot sichtbar waren (vgl. 3.1.1.1 und 3.1.1.2) verhindern ein eindeutiges Signal. Die Extinktionswerte für gecoatete Sporen sind fast doppelt so hoch, wie die der Gesamtproteinextrakte. Da die Antikörper aus Sporensuspension hergestellt wurden und somit Oberflächenproteine detektieren, lässt sich dieser deutliche Unterschied leicht erklären.

Beide Pilze stehen sich taxonomisch sehr nahe und werden von einigen Autoren als Varianten einer Art diskutiert (Russel und Mills 1993 & 1994; Shi *et al.* 1996; Hoffmann und Schmutterer 1999). Kreuzungen zwischen *T. caries* und *T. controversa* sind nachgewiesen (Silbernagel 1964, zitiert in Russel und Mills 1993). Von diesem Gesichtspunkt her kann eine Unterscheidung im ELISA nicht funktionieren. Jedoch konnte im Western Blot gezeigt werden, dass ein Nachweis sowie die Unterscheidung möglich ist. Anzumerken ist allerdings der schwächere *T. controversa* Antikörper, mit dem erst nach Natriumperjodatpehandlung der Membran eine spezifische Bande nachzuweisen war.

## **3.2 *Tilletia*-Nachweis mit monoklonalen Antikörpern**

### **3.2.1 Sequenzanalyse und Suche nach möglichen Antikörperbindestellen**

Die Verwendung von polyklonalen Antiseren hat gezeigt, dass ein Nachweis und auch eine Unterscheidung zwischen *Tilletia caries* und *Tilletia controversa* möglich ist. Ein Nachweis damit ist allerdings nur so lange möglich, bis die Seren verbraucht sind. Annähernd identische weitere Antiseren sind ohne vorherige erneute Immunisierung nicht möglich, so dass ein anderer Weg eingeschlagen wurde, um ständig Antiseren zur Verfügung zu haben. Monoklonale Antiseren bieten diese Möglichkeit „unendlich“ verfügbar zu sein, da sie via Zellkultur hergestellt und die Zelllinien in Kryogefäßen bis zur erneuten Verwendung gelagert werden können.

Zunächst wurde eine Literatur- und Datenbankrecherche durchgeführt, um entsprechende bekannte Sequenzen für die drei *Tilletia* Arten heraus zu finden. Veröffentlicht und hauptsächlich verwendet wurde der Internal Transcribed Spacer-

Bereich (ITS). Hierbei handelt es sich um hoch konservierte ribosomale DNA, welche einen Nachweis bereits in diversen Veröffentlichungen (z.B. Eibel 2002) möglich gemacht hat.

Die beiden von Eibel 2002 verwendeten Primer (vgl. 2.1.8: Tcar2A und Tcar2B) wurden bisher nur an Mycel in Pflanzenmaterial getestet. Die PCR-Bedingungen wurden deshalb zunächst beibehalten und die Primer an genomischer Sporen-DNA von *T. caries*, *T. controversa* und *T. indica* getestet. Die DNA-Isolierung aus den Sporen erfolgte nach der in 2.2.2 beschriebenen Methode. Erst mit geringerer Template DNA-Konzentration und kürzeren Annealing- und Elongationszeiten konnte eine erfolgreiche PCR mit einem Produkt von 273 bp Länge bei *T. caries* und *T. controversa* durchgeführt werden. Für *T. indica* funktionieren diese Primer nicht (vgl. Abb. 21). Ähnliche Ergebnisse sind auch bei Eibel (2002) beschrieben, wobei ebenfalls nur *T. caries* und *T. controversa* mit diesen Primern nachgewiesen werden konnten, *Tilletia ayresii* hingegen nicht.

Folgende Bedingungen wurden verwendet:

Tab. 3: PCR-Bedingungen für die ITS-Primer Tcar2A und Tcar2B.

	Phase	Dauer	Temperatur
1x	Hotstart	5 min	95 °C
35x	i) Denaturierung	1 min	95 °C
	ii) Primer-Anlagerung	15 sec	58 °C
	iii) Primer-Extension	20 sec	72 °C
1x	Finale Extension	1 min	72 °C

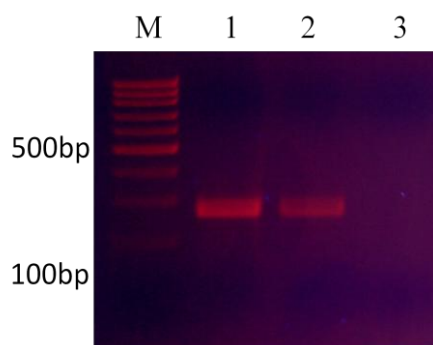


Abb. 21: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen der PCR mit den ITS Primern auf 1) *T. caries*; 2) *T. controversa* und 3) *T. indica*; M = 100 bp Marker.

Durch die hohe Konservierung auf Genomebene gibt es keine Möglichkeit hiermit Unterschiede heraus zu arbeiten, wohl aber konnte der Nachweis auch für Sporenmaterial hinsichtlich *T. caries* und *T. controversa* bestätigt werden.

Ein weiterer Bereich, der in der ncbi-Datenbank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) als Sequenz veröffentlicht ist, war HSP60. Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär in allen zu untersuchenden Pathogenen vorkommendes Hitzeschockprotein, welches auf Grund seiner Bedeutung im Proteom sehr konserviert vorkommt, in der Sequenz aber genügend Variation aufweist, um zur Unterscheidung herangezogen werden zu können.

Die Sequenzen von *T. controversa* und *T. indica* konnten direkt aus der Datenbank für die weitere Analyse verwendet werden, die Sequenz für *T. caries* fehlt.

### 3.2.2 Ermittlung der fehlenden Sequenz von *T. caries*

Unter der Annahme der hohen Verwandtschaft der 3 *Tilletia* Arten wurden die Sequenzen von *T. controversa* und *T. indica* auf hohe Übereinstimmungen überprüft und zwei Bereiche gewählt, die rechnerisch bei einer PCR ein Produkt von 380 bp Länge generieren sollen. Die hierfür synthetisierten und verwendeten HSP60 Primer Tcon1-for und Tcon2-rev (vgl.: 2.1.8) ergaben unter wenig stringenten Reaktionsbedingungen auch für *T. caries* ein 380 bp langes PCR-Produkt, welches nach Ausschneiden aus dem Gel, Aufreinigen und zweimaliger Sequenzierung für die weitere Analyse mit den anderen beiden Sequenzen verglichen wurde.

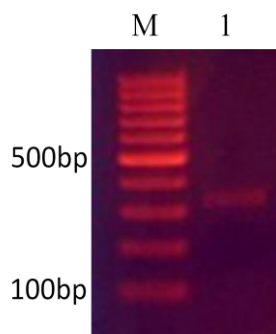


Abb. 22: 1,5%iges Agarosegel mit dem Ergebnis der PCR auf die unbekannte *T. caries* Sequenz unter Verwendung der HSP60 Primer. M = 100 bp Marker, 1 = 380 bp PCR Produkt.

Abzüglich der Randungenauigkeiten bei der Sequenzierung verblieb jeweils ein 243 bp langes Fragment, welche in drei 81 Aminosäuren (AS) lange Proteinsequenzen umgeschrieben wurden. Diese Sequenzen wurden anschließend als Basis zur Herstellung monoklonaler Anti-körper verwendet.

*T. caries*:

NKRDITTSEEISQVATISANGDTHIGKLLSNAMEKVGKEGVITVKEGKTGEDELEVTEGMKFDRGFISPYFITDTKTQKVE

*T. controversa*:

KKRAVTTSSAEISQVATISANGDHHVGSLLAAAMEKVGKEGVITVKEGKTLLEIDVTEGMRFDRGYISPYFITDVKTQKVE

*T. indica*:

KKRAVTTSAEIAQVATISANGDKHVGGLIATAMEKVGKEGVITVKEGRTLEDEIEITEGMRFDRGFISPYFITDVKTQKV

Abb. 23: Aminosäuresequenzen aus der Datenbank bzw. Sequenzierung von *T. caries*, *T. controversa* und *T. indica*.

### 3.2.3 Entwicklung spezifischer synthetischer Peptide

Da nun alle Sequenzen bekannt waren (vgl. Abb.: 23), konnten Bereiche aus der Sequenz heraus gesucht werden, die die besten Möglichkeiten hinsichtlich Hydrophobizität, Immunisierungseigenschaften und Spezifität bieten. Tendenziell hydrophilere Bereiche innerhalb einer Sequenz sollten angestrebt werden, um Oberflächenbereiche des Proteins zu verwenden und nicht die hydrophoben Kernbereiche, die bei einer Immunisierung kaum zugänglich wären. Die Sequenzen wurden deshalb mit dem Webtool ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) und dem Algorithmus nach Kyle und Doolittle untersucht. Hydrophile Bereiche weisen Scores unter 0 auf, eher hydrophobe Bereiche Scores über 0. Die Berechnung erfolgte über alle 80 Aminosäuren (Position) der drei *Tilletia* Sequenzen.



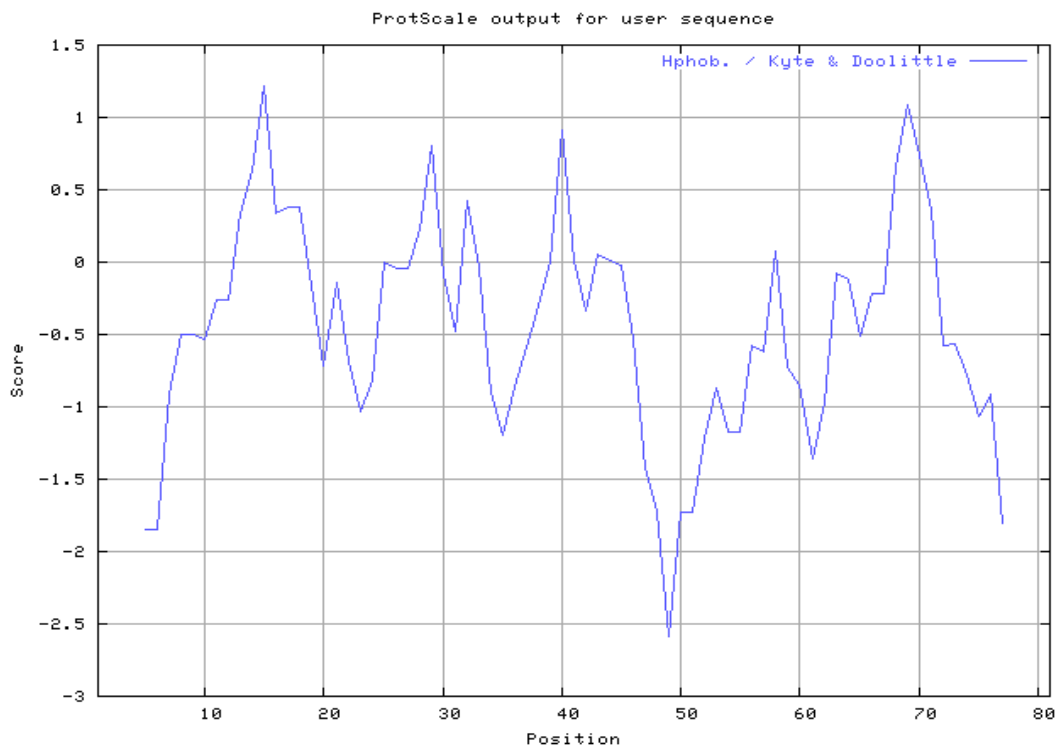


Abb. 24: Hydrophobizitätsprofil der *T. caries* AS-Sequenz.

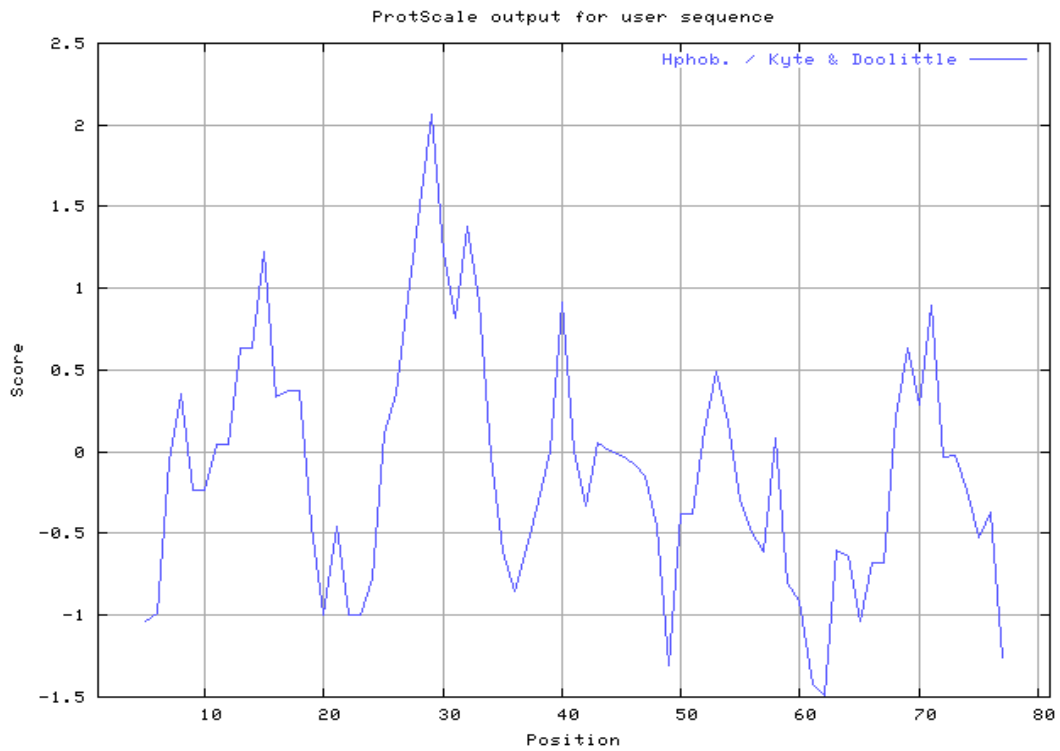


Abb. 25: Hydrophobizitätsprofil der *T. controversa* AS-Sequenz.

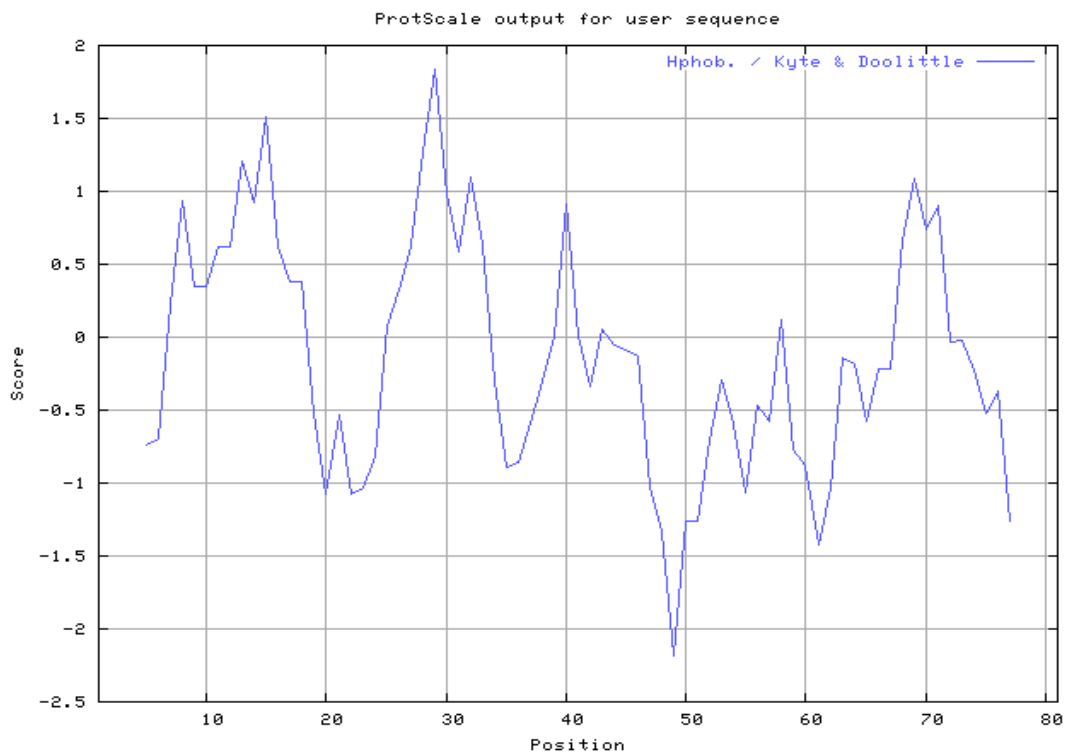


Abb. 26: Hydrophobizitätsprofil der *T. indica* AS-Sequenz.

Für die drei Sequenzen waren jeweils 2 Bereiche möglich, wobei die rot markierten Bereiche hinsichtlich Hydrophobizität und Immunisierungseigenschaften besser geeignet waren und für die Synthese von Peptiden Verwendung gefunden haben (vgl. Abb.: 23). Die Synthese der Peptide wurde von der Firma Biogenes aus Berlin durchgeführt und in einer Konzentration von 1 mg/ml geliefert.

### 3.2.4 Monoklonale Antikörper

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden Mäuse mit den synthetischen Peptiden durch Dr. Frank Rabenstein, Institut für Resistenzforschung und Pathodiagnostik in Quedlinburg, immunisiert und nach dem hauseigenem Protokoll weiter verfahren. Die antikörperproduzierenden Myelomzellen wurden gescreent und nach Erkennen des jeweiligen synthetischen Peptids selektiert. Die mAKs zeigten im ELISA gute Absorptionswerte, jedoch auch Wechselwirkungen untereinander mit den artfremden Peptiden (vgl. Abb. 27).

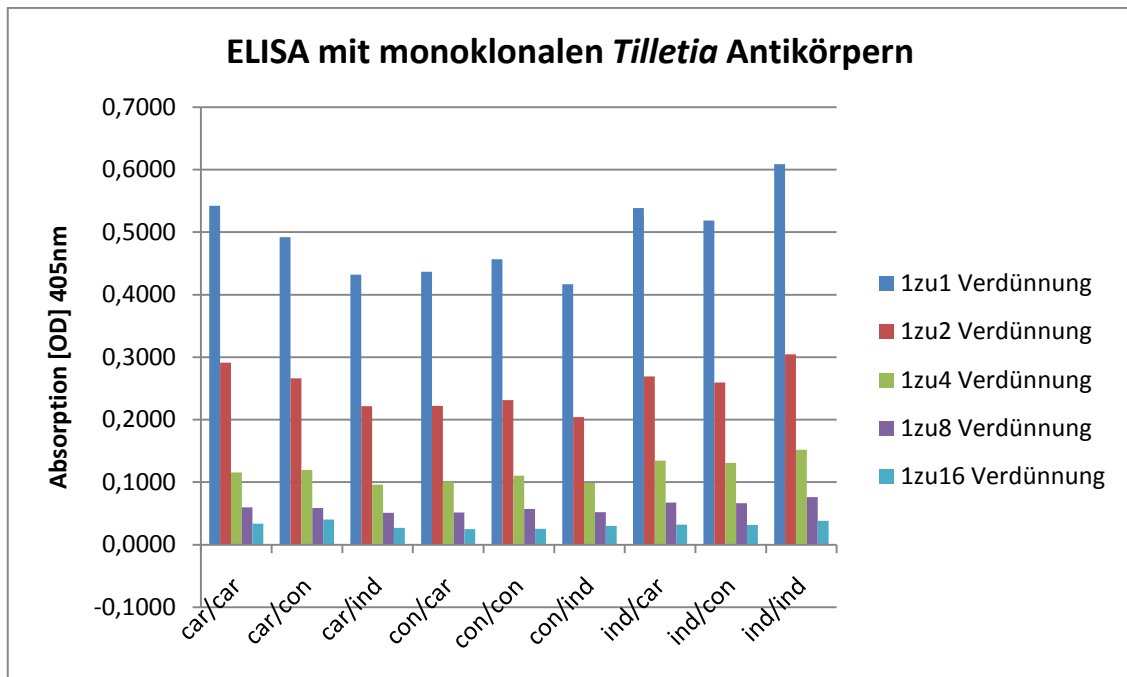


Abb. 27: ELISA mit den monoklonalen *Tilletia* Antikörpern auf Gesamtproteinextrakt der drei Arten. car/car = *T. caries* Antigen/*T. caries* Antikörper; car/con = *T. caries* Antigen/*T. controversa* Antikörper usw.

Die monoklonalen Antikörper weisen jeweils die höchste Absorption für ihre eigene Art in allen Verdünnungsstufen auf. Die Wechselwirkungen mit den jeweils anderen beiden Arten sind für einen spezifischen Antikörper zu hoch, als dass ein Nachweis damit möglich wäre. Für einen Test mittels ELISA scheint der verwendete AS-Bereich zu unspezifisch zu sein und andere Sequenzabschnitte müssen untersucht werden. Dass ein Nachweis und die Unterscheidung anhand HSP60 grundsätzlich möglich sind, zeigt der folgende Abschnitt.

### 3.3 *Tilletia*-Nachweis mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 3.3.1 Sequenzanalyse

Für den genomdiagnostischen Nachweis wurde identisch zu den synthetischen Peptiden verfahren. Die HSP60-Sequenzen dienen wieder als Template, hier jedoch für die Primer. Zunächst wurden die drei Sequenzen mit dem Webtool ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) gegenübergestellt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten darstellen zu lassen.

```

con      CAAGAAGCGCGCCGTCACAACCTCCTCAGAGATCTCGCAAGTGGCCACCATCTCGGCAAA 60
ind      GAAGAAGCGCGCTGTCACCACTTCCGCAGAGATCGCCCAGGTGCGCCACAATCTCCGCCAA 60
car      CAACAAGAGGGACATCACCACCAGCGAGGAGATCTCNCAGGTGCGCCACCATCTCCGCCAA 60
          ** ** * * ** * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

con      CGGCGATCACCACGTCGGAAGCCTGATTCGGCCGCCATGGAGAAGGTGCGCAAGGAGGG 120
ind      CGGAGACAAGCACGTCGGAGGTCTCATCGCCACA GCCATGGAGAAGGTGCGCAAGGAAGG 120
car      CGGNGACACACACATTGGCAAGCTCCTGTCCAACGCCATGGAGAAGGTGCGAAAGGAGGG 120
          ** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

con      TGTCATCACCGTCAAGGAGGGCAAGACCCTGCTCGACGAGATTGACGTCACCTGAGGGTAT 180
ind      TGTCATCACCGTCAAGGAAGGTGCGACCCTCGAAGACGAGATCGAGATCACCAGGGTAT 180
car      TGTCATCACNGTCAAGGAGGGCAAGACCANTGAGGACGAGCTCGAGGTACCCGAGGGTAT 180
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

con      GCGCTTCGACCGCGGTTACATCTCCCCTTACTTTATCACCGACGTCAAGACCCAAAAAGT 240
ind      GCGATTTCGACCGTGGTTTCATCTCCCCTTACTTTCATCACCGACGTCAAGACCCAAAAAGT 240
car      GAAGTTCGACCGTGGATTTCATCTCCCCCTACTTTCATCACCGACACCAAGACCCAGAAGGT 240
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

con      CGAGT 245
ind      TGAGT 245
car      NGAGT 245
          ****

```

Abb. 28: Vergleich der HSP60 Sequenzen von *T. caries* (car), *T. controversa* (con) und *T. indica* (ind) mittels ClustalW2. Rote Sterne zeigen eine Homologie bei allen drei Sequenzen an derselben Position.

Die Sequenzen weisen einige längere homologe Bereiche auf, v.a. zum 3'-Ende hin, am 5'-Ende zeigt sich eine hohe Variabilität.

#### 3.3.2 Primerdesign

Aus den Gegebenheiten der Sequenzen war die Überlegung, einen für alle drei identischen Reverse-Primer zu verwenden und die Forward-Primer spezifisch zu gestalten. Somit funktioniert die PCR nur bei einer spezifischen Primer-Template-

Kombination. Die hauptsächlich für diagnostische Nachweise verwendeten ITS-Sequenzen sind hier aus den bereits oben genannten Gründen nicht anwendbar. Die drei *Tilletia*-Arten sollen auch voneinander unterschieden und nicht nur nachgewiesen werden. Rein rechnerisch sind die zu erwartenden PCR-Produkte 157 bp (*T. caries*), 162 bp (*T. controversa*) und 155 bp (*T. indica*) lang (vgl. Abb. 29).

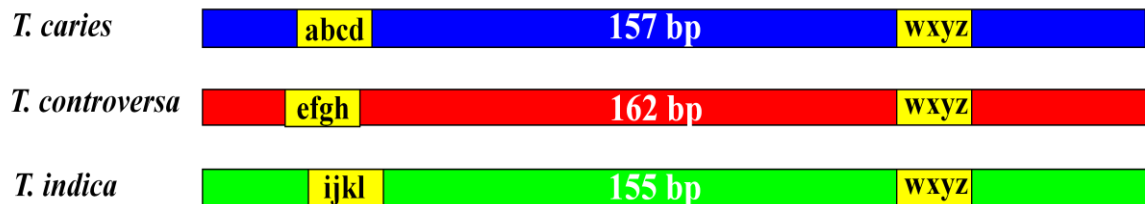


Abb. 29: Darstellung der erwarteten PCR-Produkte mit den spezifischen und dem universellen Primer.

### 3.3.3 PCR-Test auf *Tilletia*

#### 3.3.3.1 Temperaturoptimierung

Die synthetisierten Primer haben laut Angaben einen Schmelzpunkt von 50-52°C. Zunächst wurde die optimale Temperatur bestimmt, um die deutlichsten und eindeutigsten Ergebnisse zu erhalten. Hierfür wurden fünf identische PCR-Ansätze vorbereitet und innerhalb eines Temperaturgradienten von 46 – 50 °C untersucht. Je niedriger die Temperatur gewählt wird, umso unspezifischer wurden die Ergebnisse, umso höher die Wahl ausfiel, umso undeutlicher waren die Ergebnisse oder es ergab sich kein PCR-Produkt. Als optimal hat sich für alle Primer 48°C heraus gestellt (vgl. Abb. 30, Spur 4). Untersuchungen von Negativkontrollen bei Temperaturen unter 48 °C zeigen oftmals falsch positive Ergebnisse auf (Daten nicht gezeigt).

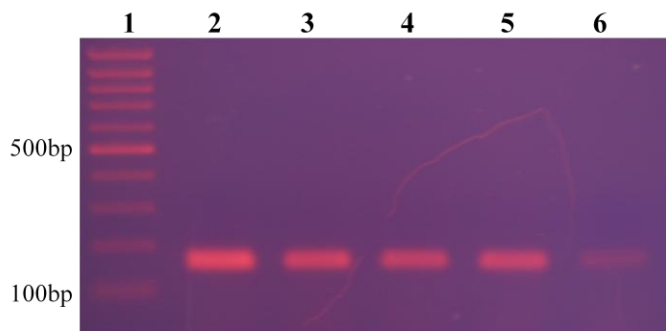


Abb. 30: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen der Temperaturoptimierung der Primerpaare. 1 = 100 bp Marker. 2 - 6 = 46 – 50 °C Annealling-Temperatur.

### 3.3.3.2 Nachweisgrenze

Für die Verwendung von Saatgut wurde in Bayern ein Grenzwert von maximal 20 Sporen pro Korn vereinbart, unter dem befallenes Saatgut noch angebaut werden darf. Aus diesem Grund wurde eine Nachweisgrenze bestimmt, ob die Primer diese Grenze in einer Untersuchung unterschreiten können.

Zur Bestimmung dieser Nachweisgrenze wurde die DNA aus 50 – 1000 Sporen isoliert und zur Bestimmung mit den drei Primerpaaren eingesetzt. Da ein direktes Abzählen der Sporen auf Grund deren Größe nicht möglich war, wurden mehrere Verdünnungsreihen in Wasser durchgeführt, um rechnerisch auf diese Sporenanzahl zu kommen. Nach Abzentrifugieren des Wassers wurde mit den weiteren Protokollen zur DNA-Isolierung weiter verfahren.

Bei der DNA-Isolierung mit dem Qiagen Kit konnten noch alle Verdünnungsstufen nachgewiesen werden, bei der Mikrowellenmethode (vgl. 2.2.2 für beide Methoden) gelang dies erst ab 500 Sporen. Werden diese Zahlen auf die nach ISTA zu untersuchenden 300 Körner umgerechnet, ergibt sich eine Nachweisgrenze von unter 1 Spore pro Korn für die DNA-Isolation nach Qiagen ( $50/300 = 0,16$ ) und für die DNA-Isolation mittels Mikrowelle eine Nachweisgrenze von unter 2 Sporen pro Korn ( $500/300=1,66$ ). Für alle drei Primerpaare wurde die gleiche Nachweisgrenze bestimmt, die in Abb. 31 exemplarisch für das *T. caries* Primerpaar dargestellt ist. Aufgrund der

höheren Spezifität und reineren Ausgangs-DNA wurde für die weiteren Arbeiten nur noch der *DNeasy Plant Mini Kit* von Qiagen verwendet.

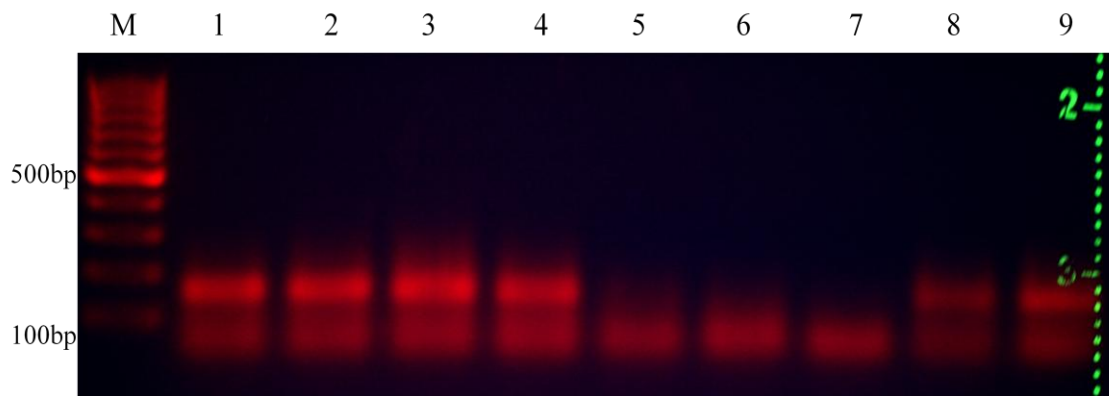


Abb. 31: 1,4%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für die Bestimmung einer Nachweisgrenze unter Verwendung zweier DNA-Isolierungsmethoden. Spuren 1-4: *DNeasy Plant Mini Kit* von Qiagen; Spuren 5-9: Mikrowelle. M = Marker; Spuren 1+5: 50 Sporen; 2+6: 100 Sporen; 3+7: 200 Sporen; 4+8: 500 Sporen; 9: 1.000 Sporen.

Die Verwendung der Mikrowellenmethode zur DNA-Extraktion hat gezeigt, dass auch eine sehr schnelle Methode hierfür zur Verfügung steht. Sofern die Sensitivität nicht zurück geht, bzw. wie im dargestellten Fall noch optimiert werden muss, steht der Verwendung nichts im Wege. Für die weiteren Versuche zur Etablierung der Primer wurde allerdings auf die DNA-Extraktion mit dem Qiagen Kit zurück gegriffen.

### 3.3.3.3 Validierung der Primer

Alle drei Primerpaare konnten ihre Funktion in einer PCR erfüllen. Der nächste Schritt war die Validierung der Primer anhand Kreuztests mit den jeweils beiden anderen *Tilletia*-Arten, mit anderen vorkommenden samen- und bodenbürtigen Pathogensporen sowie an einer größeren Anzahl weiterer Proben aus unterschiedlichen Herkünften.

Zunächst wurden die Wechselwirkungen der Primer mit den drei *Tilletia*-Arten untereinander untersucht. Hierbei wurden je drei mal die drei verschiedenen Primerkombinationen auf *T. caries*, *T. controversa* und *T. indica* in einer PCR angewendet. Wie in Punkt 3.3.2 dargestellt funktioniert die PCR nur dann, wenn die

korrekte Primer/Template-Kombination zusammen trifft. In Abb. 32 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die *T. caries* Primerkombination erkennt nur *T. caries* DNA (Spur 2) und zeigt keine oder nur unspezifische Wechselwirkungen mit DNA von *T. controversa* (Spur 3) oder *T. indica* (Spur 3). Identisch verhält es sich mit den Primerkombinationen für *T. controversa* (Spuren 4-6) und *T. indica* (Spuren 8-10), welche nur ihre eigene Art erkennen (Pfeile). Zusätzlich wurden die PCR-Produkte aus den Spuren 2, 6 und 10 sequenziert und mit den bekannten Sequenzen verglichen. In allen drei Fällen handelt es sich um die korrekte Sequenz im Bereich der möglichen Sequenzierung (Ungenauigkeiten an den Enden der Sequenzierungen waren zu erwarten, da das PCR-Fragment direkt sequenziert wurde).

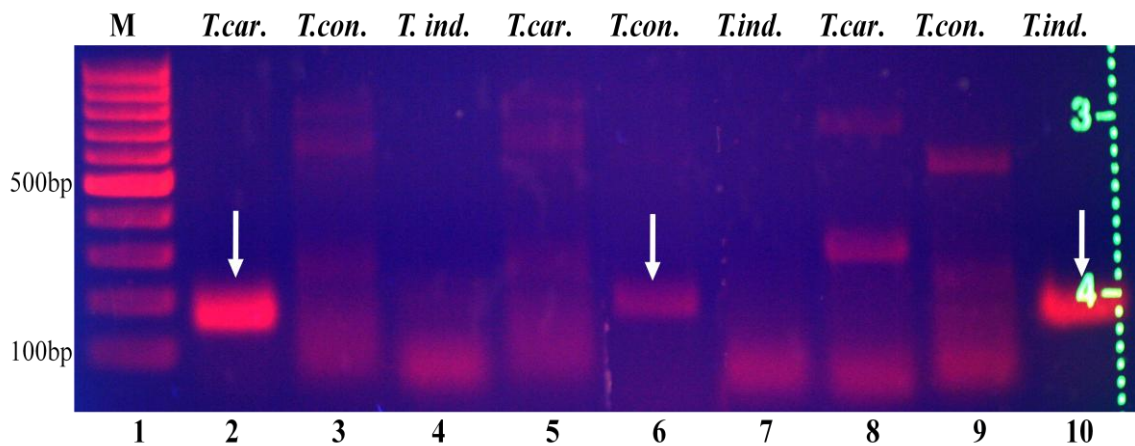


Abb. 32: 1,5%iges Agarosegel mit PCR Ergebnissen der unterschiedlichen spezifischen Primerkombinationen. Spur 1: 100bp Marker; Spuren 2-4: *T. caries* Primerkombination; Spuren 5-7: *T. controversa* Primerkombination; Spuren 8-10: *T. indica* Primerkombination.

Um auszuschließen, dass die Primerpaare nicht andere samen- oder bodenbürtige Pathogene erkennen, wurde eine PCR mit folgenden Arten, die allesamt an derselben Wirtspflanze vorkommen können, durchgeführt: *Fusarium poae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Microdochium nivale*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium gladicola*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium ER 21*.



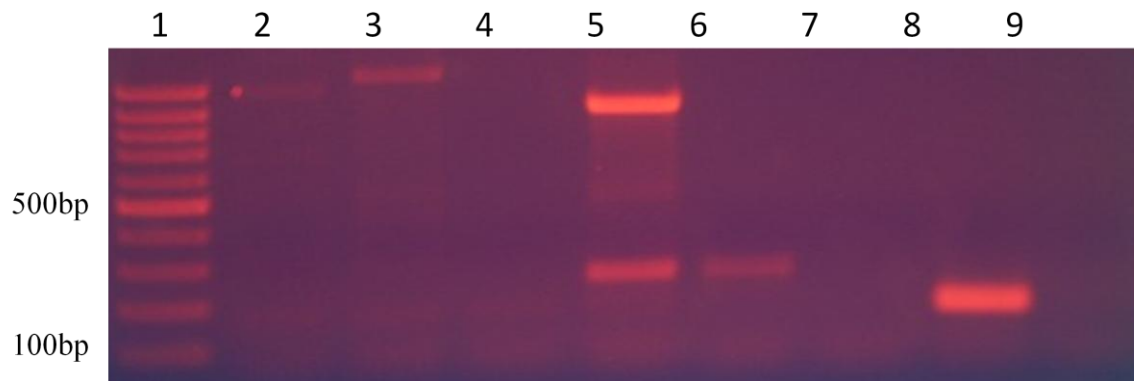


Abb. 33: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen der PCR auf verschiedene samen- und bodenbürtige Pathogene. Spur 1: Marker, Spuren 2: *Fusarium poae*, 3: *Fusarium graminearum*, 4: *Fusarium culmorum*, 5: *Microdochium nivale*, 6: *Aspergillus fumigatus*, 7: *Penicillium gladicola*, 8: *Alternaria alternata*, 9: *Cladosporium ER 21*.

Die Ergebnisse zeigen keine Bande bei den zu erwartenden ~160 bp auf. Die Bande in Spur 8 verläuft bei ~200 bp und wurde durch eine Sequenzierung ausgeschlossen. Die Primerpaare sind also spezifisch zu ihren eigenen Arten.

Ausgeweitet wurde die Validierung auf die Untersuchung von verschiedenen Sporenherkünften, mit Sporen aus einigen deutschen Bundesländern sowie aus Frankreich.

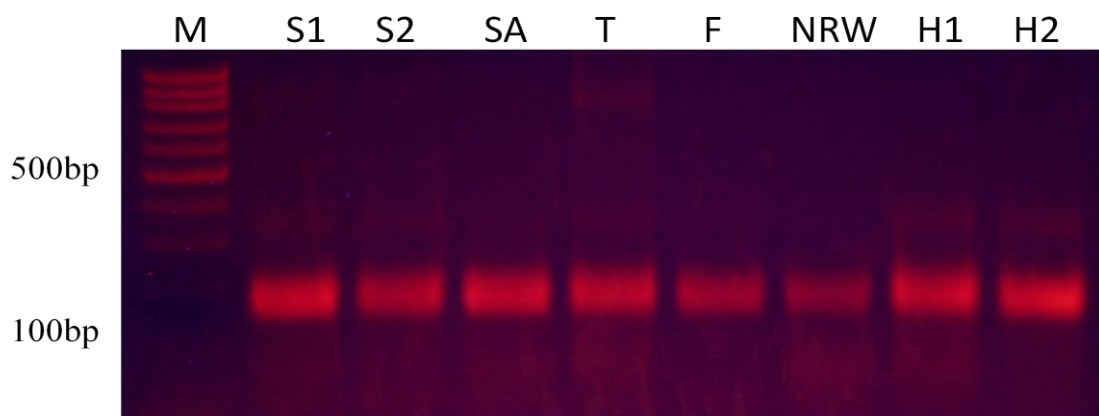


Abb. 34: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für das *T. caries* Primerpaar auf Sporen-DNA verschiedener Herkünfte deutscher Bundesländer (S1 u. 2 = Sachsen, T = Thüringen, NRW = Nordrhein-Westfalen, H1 u. 2 = Hessen) und Frankreich (F).

Wie in Abb. 34 zu sehen ist, konnten alle Herkünfte eindeutig als *T. caries* bestimmt werden, da alle Proben die charakteristische Bande bei ~160 bp aufweisen. Eine Kontrolle mit dem *T. controversa* Primer ergab keine Bande bei ~160 bp (vgl. Abb. X).

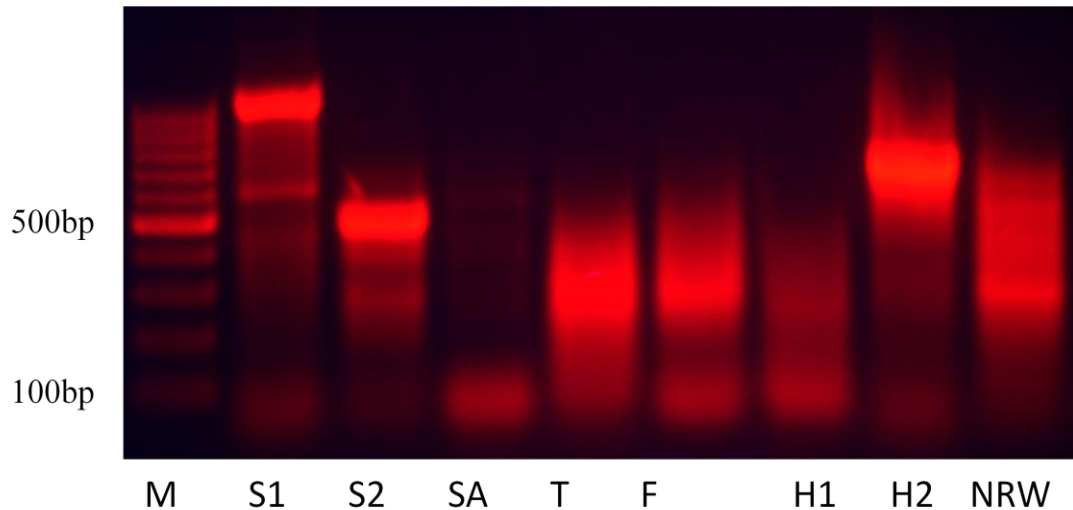


Abb. 35: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für das *T. controversa* Primerpaar auf Sporen-DNA verschiedener Herkünfte deutscher Bundesländer als Negativkontrolle.

Für *T. indica* standen nur 2 Herkünfte zur Verfügung, da der Quarantäneschädling nur unter hohen Auflagen nach Deutschland eingeführt werden darf. Beide Herkünfte, zum Einen aus Punjab, Indien und zum Anderen aus Mexiko konnten eindeutig nachgewiesen werden, was die charakteristische Bande bei ~160 bp in Abb. 36 zeigt.

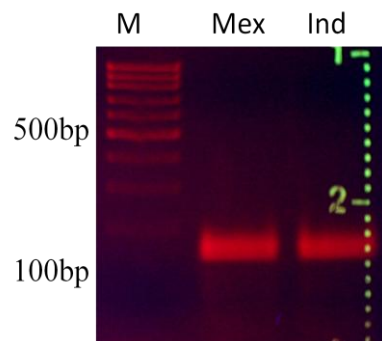


Abb. 36: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für zwei *T. indica* Herkünfte, nachgewiesen mit dem spezifischen *T. indica* Primerpaar. M = 100 bp Marker, Mex = Mexiko, Ind = Indien.

Auch für die *T. caries* und *T. controversa* Primerpaare wurden weitere internationale Herkünfte untersucht. Blair Goates von United States Department of Agriculture (USDA) stellte 11 *T. caries* und 7 *T. controversa* infizierte Ähren verschiedener Herkunft aus den USA zur Verfügung. Aus den infizierten Ähren wurde jeweils eine Brandbutte isoliert, die Buttenhülle vorsichtig entfernt und die Sporen in ein ERG gegeben und die DNA wie in Punkt 2.2.2 beschrieben isoliert.

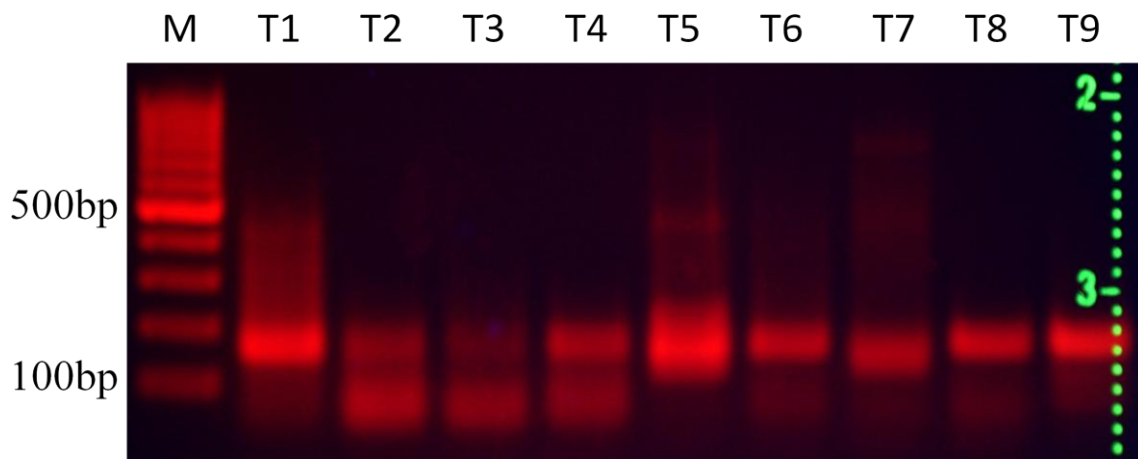


Abb. 37: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für 9 *T. caries* Herkünfte aus den USA, die mit dem *T. caries* Primerpaar nachgewiesen wurden.

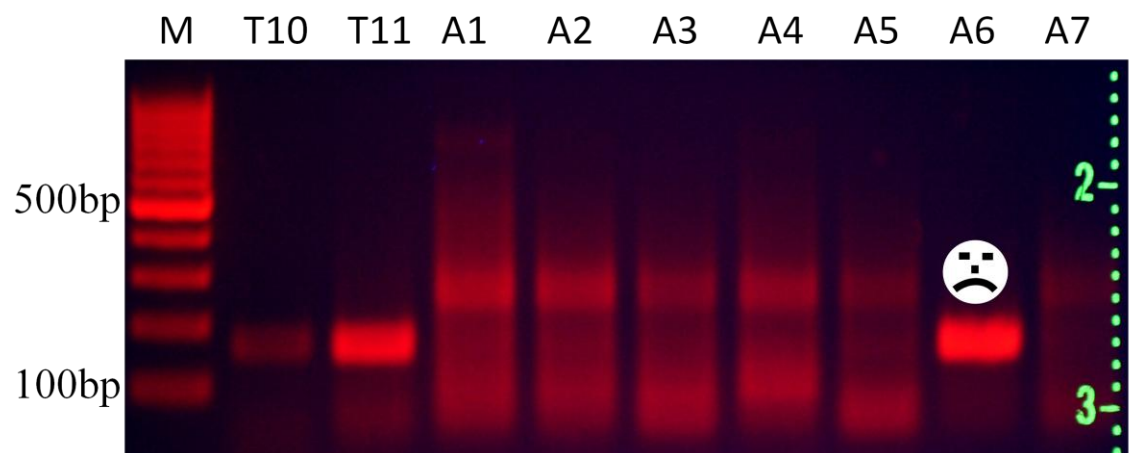


Abb. 38: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für 2 *T. caries* und 7 *T. controversa* Herkünfte aus den USA, die mit dem *T. caries* Primerpaar nachgewiesen wurden. Die invers nachgewiesenen Herkünfte A1 – A7 stellen die Negativkontrolle dar.

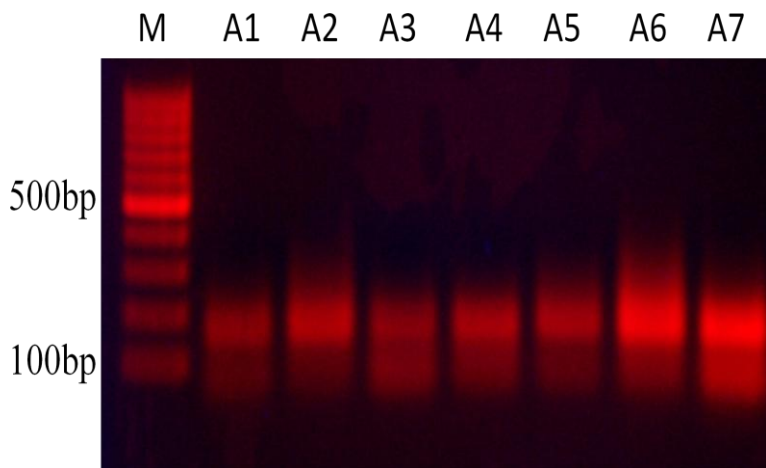


Abb. 39: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für 7 *T. controversa* Herkünfte aus den USA, die mit dem *T. controversa* Primerpaar nachgewiesen wurden.

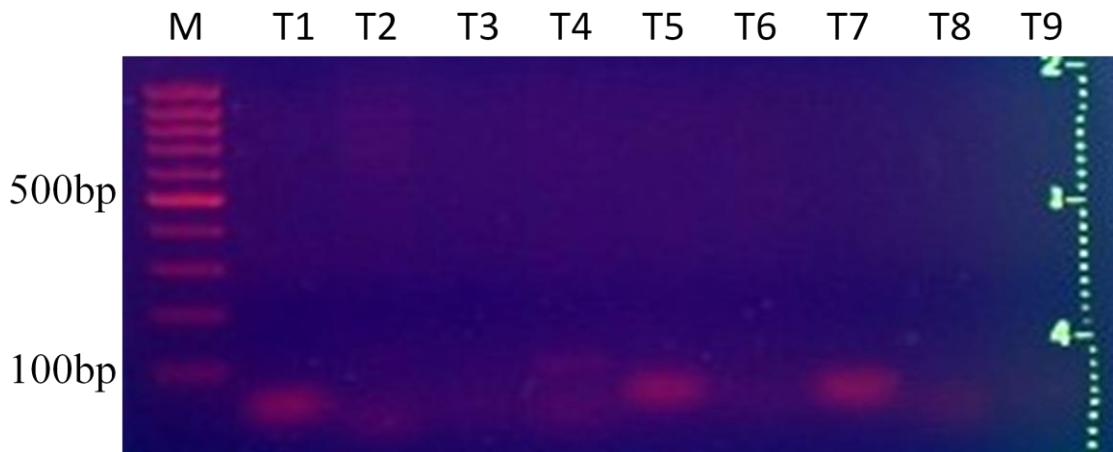


Abb. 40: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für 9 *T. caries* Herkünfte aus den USA, die mit dem *T. controversa* Primerpaar als Negativkontrolle nachgewiesen wurden.

Mit den entwickelten Primerpaaren konnten alle deutschen Herkünfte korrekt nachgewiesen werden, ebenso die Probe aus Frankreich. Bei den Herkünften aus den USA gab es falsch positive Reaktionen v.a. beim *T. controversa* Primerpaar (vgl. Abb. 38 → A6). Der größte Teil der Proben zeigt die Bande bei 160 bp bei korrekter Primer-Template Kombination und keine bzw. unspezifische Banden bei falschen Kombinationen in den Kontrollreaktionen. Die falsch positiven Ergebnisse werden auf Rassenunterschiede zurück geführt, welche bisher nur auf chinesische Herkünfte bzw. Herkünfte aus den USA beschränkt aufgetreten sind. In weiteren Untersuchungen muss dieses Nachweissystem dahingegen optimiert werden, dass die Arten unterschieden

werden, Rassenunterschiede aber keine Rolle spielen. Hierfür sollte für jede Art eine große Menge an Sporen-DNA sequenziert werden, um Primer zu entwickeln, die die Rassenunterschiede ignorieren.

Neben der Optimierung, die jedoch für jede Art von Nachweisverfahren erfolgen muss, stellt die DNA-Extraktion den aufwändigsten Teil bei der Anwendung des Verfahrens dar. Dies ist somit in einem Screening von größeren Mengen an Proben der limitierende Faktor. Trotzdem sind ein Nachweis und die Unterscheidung in 3-4h durchführbar. Vergleicht man diese Zeit mit der klassischen mikroskopischen Methode nach ISTA, so verlängert sich die aufzuwendende Zeit um ein Vielfaches. Je mehr Proben zu untersuchen sind, umso effektiver wird die PCR-Methode. Da mit der zunehmenden Problematik des vermehrten *Tilletia*-Befalls (Jahn *et al.*, 2003) in Zukunft eine viel höhere Anzahl an zu untersuchenden Proben anfallen wird, kann diese neue Methode ihren Vorteil der Automatisierung für viele Proben ausspielen.

### 3.3.4 Quantifizierung mit der Real Time PCR

Ein qualitativer Nachweis mittels PCR ist nach den vorhin beschriebenen Methoden möglich. Um essentielle quantitative Ergebnisse zu erhalten, muss auf eine andere Technik zurück gegriffen werden, die Real Time PCR (vgl. 2.2.3.2). Wie in den einleitenden Worten beschrieben, werden im Ökologischen Landbau Saatgutpartien nur dann freigegeben, wenn eine Sporenbelastung von  $< 20$  Sporen pro Korn getestet wurde. Somit wird eine Aussage über die Anzahl an Sporen pro Korn benötigt, woraus sich ablesen lässt, ob eine entsprechende Saatgutpartie noch anbauwürdig ist oder nicht.

Die spezifischen qualitativen Forward-Primer haben eine Differenzierung bereits möglich gemacht und deren Bindungsbereich in den Pathogensequenzen dient für die quantitativen Sonden in der Real Time PCR als Ausgangsbasis. Die drei *Tilletia*-Sequenzen wurden mittels der File Builder 3.1 Software der Firma Applied Biosystems ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) verrechnet, um spezifische Sonden zu erhalten. Die jeweiligen Unterscheidungsbereiche konnten angegeben werden und die Synthese wurde anschließend von der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Für die Sonden wurde eine Synthese mit MGB (Minor Groove Binder) gewählt, um eine niedrigere

Annealing-Temperatur verwenden zu können, was zusätzlich die Spezifität der Sonden steigert.

Für die Untersuchung der Pathogene mittels Real Time PCR wurde zunächst eine Standardgerade mit unterschiedlicher Sporenanzahl erstellt. Hierfür wurden für jede Sporenanzahl 10 DNA-Isolationen durchgeführt und gemischt, um ein möglichst genaues Resultat mit geringer Streuung zu erhalten. DNA von Sporenmengen zwischen 1.000 und 100.000.000 wurden jeweils zweimal für eine Reaktion eingesetzt, um bei einem Ausfall noch ein Backup zur Verfügung zu haben (vgl. Abb.: 41).

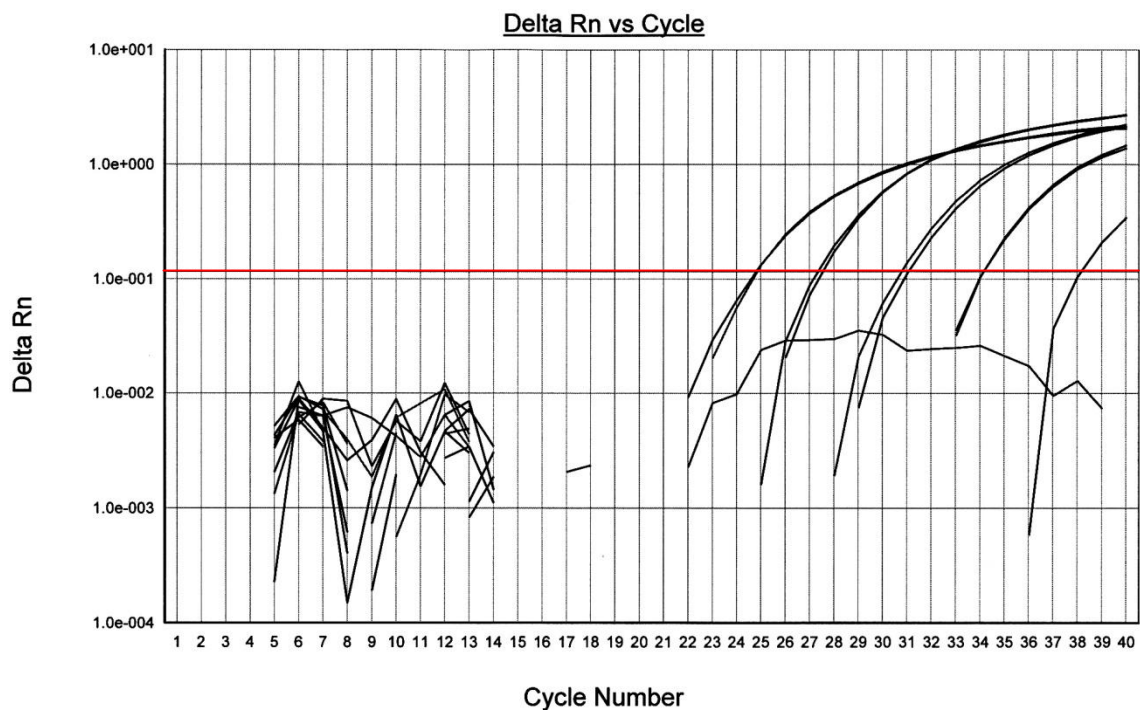


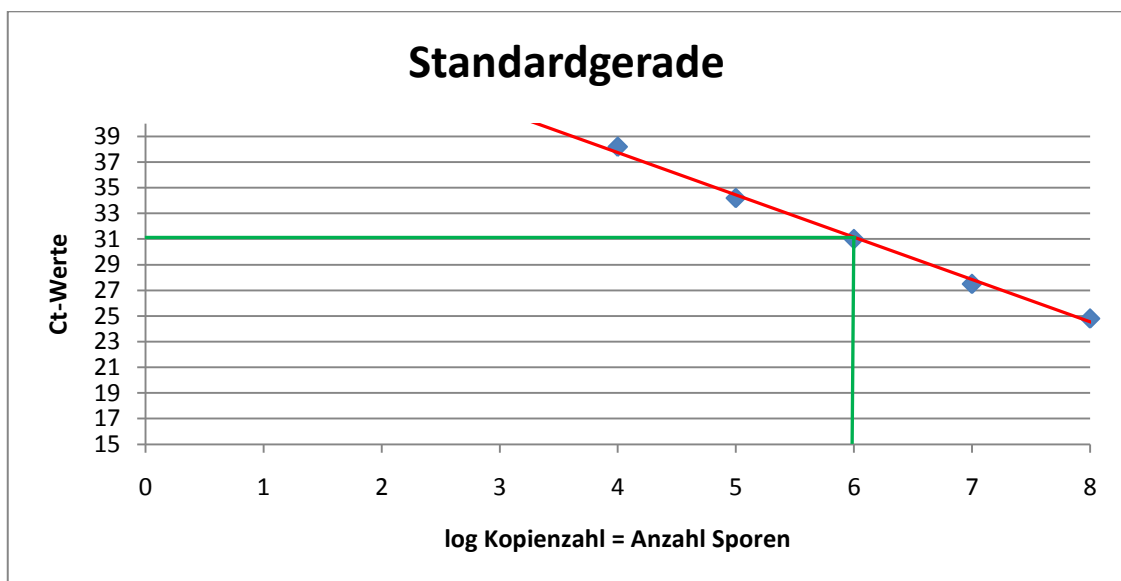
Abb. 41: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. caries* Sonde auf *T. caries* DNA zur Bestimmung einer Standardgeraden. Delta Rn beschreibt die logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensität.

Aus den Schnittpunkten der jeweiligen Graphen mit der roten Linie (=  $C_t$ -Wert) in Abhängigkeit mit der Zyklennummer lässt sich eine Standardgerade erstellen, die in Tab. 4 dargestellt ist. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase (Bereich der exaktesten Ergebnisse) messen zu können, wird der  $C_t$ -Wert (engl. *Cycle Threshold* für

Schwellenwert-Zyklus) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die sehr gute lineare Abhängigkeit ohne große Streuung der einzelnen Punkte in der Standardgerade zeigt eine gute Qualität der Sonden sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf. Ein Schnittpunkt bei Zyklennummer 31 bedeutet also eine Sporenanzahl von  $10^6$ , sprich 1.000.000 Sporen. Um zu überprüfen, ob die Reaktionen die korrekten Fragmente geliefert haben, wurden sie auf einem 1,5%igem Agarosegel überprüft. Die Banden verliefen korrekt auf der erwarteten Höhe von ~160 bp und eine Sequenzierung bestätigte ebenfalls die Richtigkeit.

Tab. 4: Standardgerade für die Bestimmung der Sporenanzahl nach einer quantitativen PCR. 1 =  $10^1$  Sporen; 8 =  $10^8$  Sporen



Anwendung gefunden hat diese Methode bei einer infizierten Weizenprobe mit unbekanntem Sporenbefall. Zunächst wurden von 300 Körnern die Sporen wie in Punkt 2.4.1 beschrieben abgewaschen, die DNA isoliert und in Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:1.000 für die Real Time PCR eingesetzt (vgl. Abb. 42). Als Ergebnis ergibt sich für die 1:10 Verdünnung ein  $C_t$ -Wert von 26,5. Dieser Wert entspricht in Abhängigkeit der Verdünnungsstufe und anhand der Standardgerade einer Menge von berechneten 199.526.231 Sporen. Die beiden anderen Verdünnungsstufen bestätigen diesen Wert.

Wird diese Anzahl auf die untersuchten 300 Körner bezogen, so ergibt sich ein Befall von ~ 665.000 Sporen pro Korn.

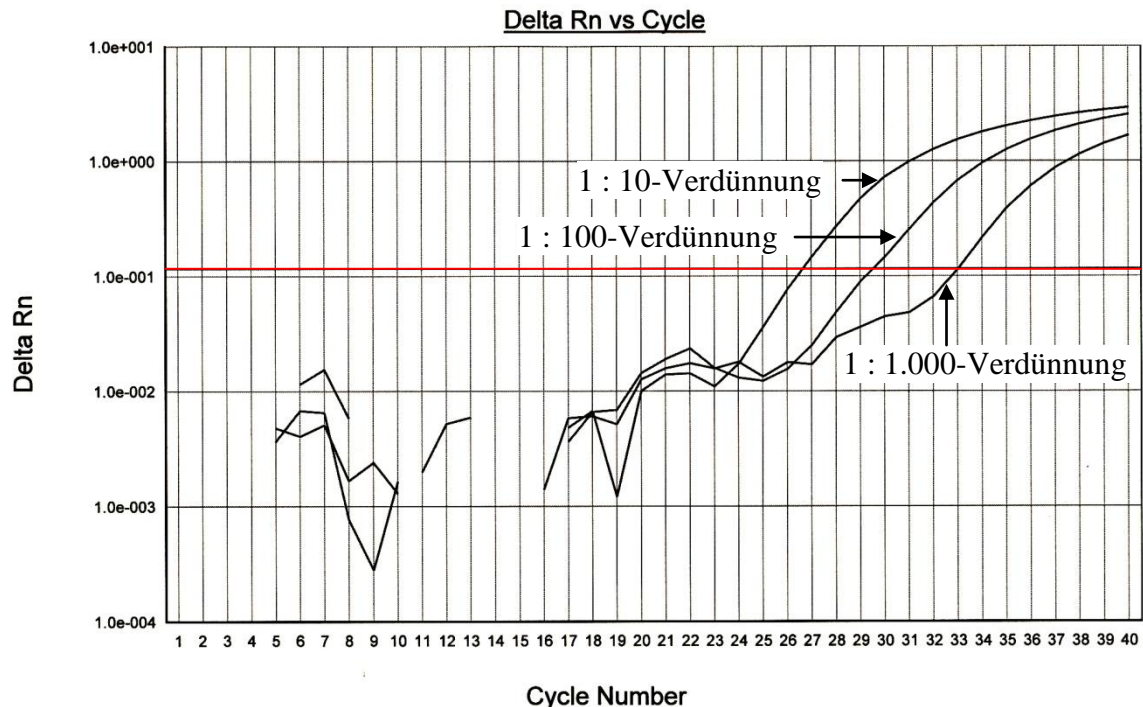


Abb. 42: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. caries* Sonde auf eine *T. caries* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

Identische Versuchsbedingungen wie eben beschrieben herrschten für die Untersuchung von einer *T. controversa* sowie einer *T. indica* Probe mit unbekannter Sporenanzahl. Im Falle von *T. controversa* konnten keine  $C_t$ -Werte bestimmt werden, da keine Signale detektierbar waren (vgl. Abb. 43). Eine vorherige optische Bestimmung der Sporen hatte jedoch *T. controversa* bestätigt. Ebenfalls bestätigt hat sich das Vorhandensein von DNA auf einem Agarosegel.

Für die spezifische *T. indica*-Sonde konnten Signale erhalten werden, die in Abb. 44 graphisch dargestellt sind. Für die 1:10-Verdünnung wurde ein  $C_t$ -Wert von 25 bestimmt. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und der Eichgerade aus Tab. 3 kann eine Menge von 1 Mrd. Sporen abgelesen werden, was die beiden anderen Verdünnungsstufen wieder bestätigen konnten. Wiederum bezogen auf die eingesetzte Menge von 300 Körner ergibt sich eine Anzahl von ~3,33 Mio. Sporen pro Korn.



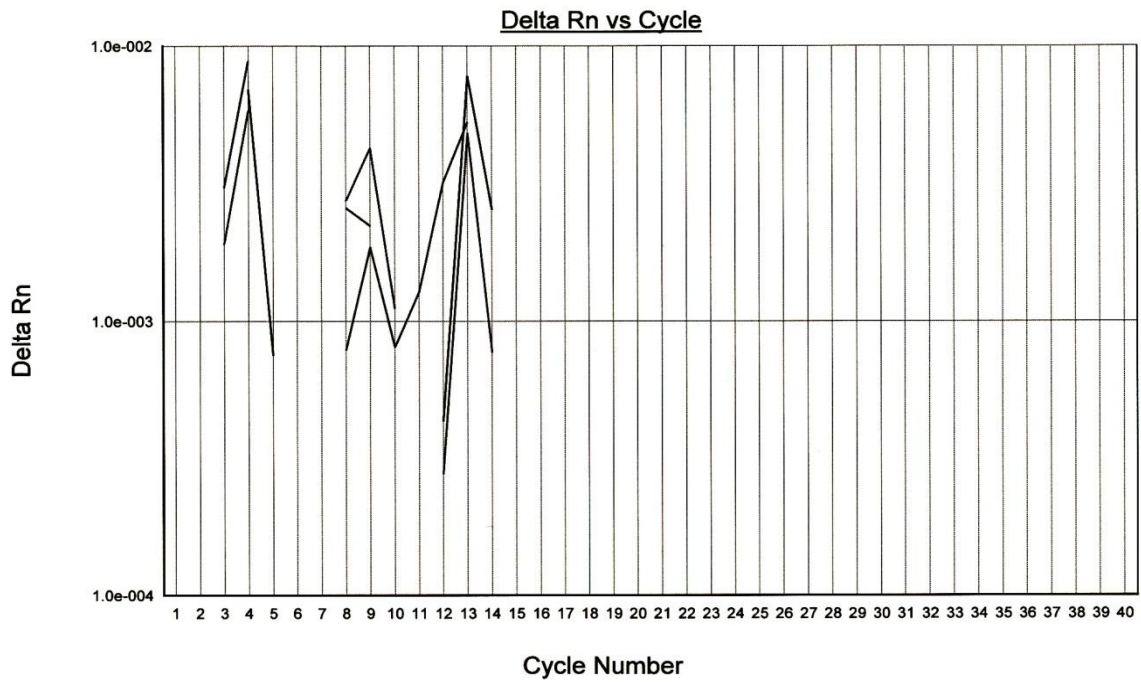


Abb. 43: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. controversa* Sonde auf eine *T. controversa* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

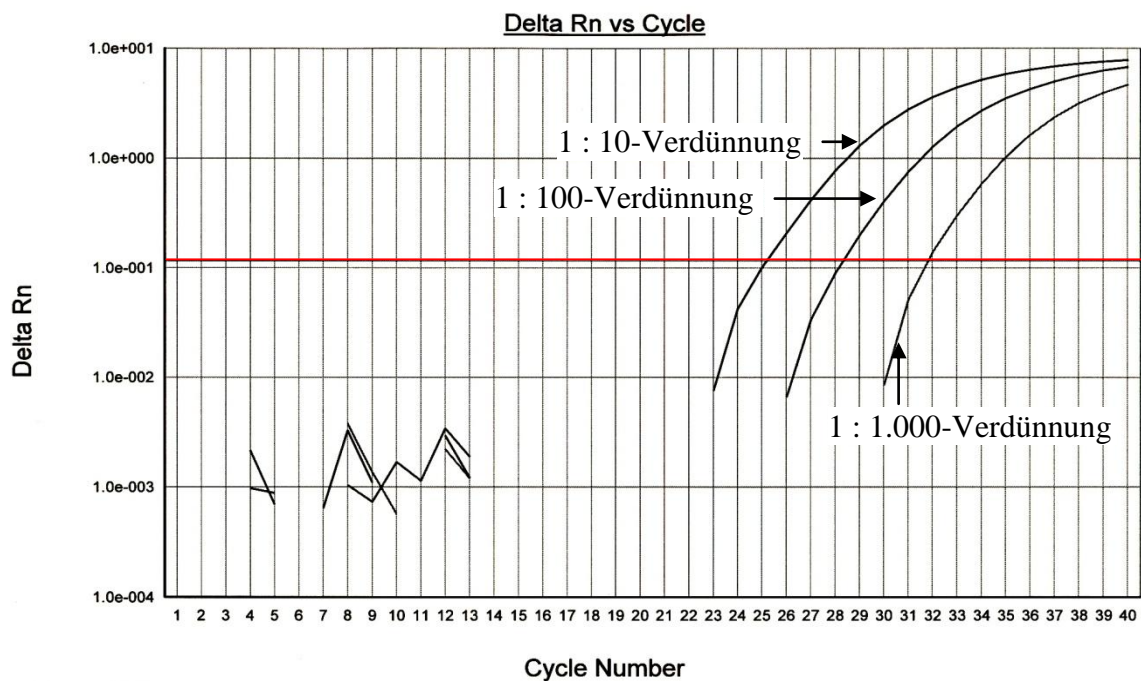


Abb. 44: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. indicas* Sonde auf eine *T. indica* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

Um die Spezifität der quantitativen PCR-Sonden zu überprüfen, wurden in weiteren Experimenten die einzelnen Sonden jeweils auf die beiden anderen Arten angewendet und eine Negativkontrolle ohne DNA durchgeführt. Alle Abbildungen hierzu sind im Anhang aufgelistet (vgl. Abb. 57-59, S. 91-92).

Bei der Negativkontrolle konnten erwartungsgemäß keine Fluoreszenzsignale detektiert werden.

Die *T. caries* Sonde bindet spezifisch nur *T. caries*-DNA und weist erst bei sehr hohen Sporenmengen leichte Wechselwirkungen mit *T. indica*-DNA auf. Wechselwirkungen mit *T. controversa* DNA konnten nicht beobachtet werden.

Die *T. controversa* Sonde scheint nicht korrekt zu binden, da keine Signale für *T. controversa* DNA detektierbar waren, jedoch größere Wechselwirkungen mit *T. caries* als auch mit *T. indica* DNA aufgetreten sind.

Die *T. indica*-Sonde bindet spezifisch *T. indica* DNA und weist erst bei extrem hohen Sporenmengen leichte Wechselwirkungen mit *T. indica* DNA auf. Wechselwirkungen mit *T. controversa* DNA konnten nicht beobachtet werden.

Mit Hilfe der Real Time-PCR ist nun eine erste Quantifizierung möglich und die Ergebnisse sind vielversprechend. Mit Ausnahme der *T. controversa*, konnten alle Arten spezifisch nachgewiesen werden. Die minimale hier nachweisbare Sporenmenge beträgt 10.000 Sporen. Für die Standardgerade wurden auch 1000 Sporen eingesetzt, welche allerdings nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Bezogen auf die in der Untersuchung verwendeten 300 Körner entspricht dies einer Sporenbelastung von ~33 Sporen pro Korn. Diese Konzentration ist noch viel zu hoch, um in der Praxis anwendbar zu sein. Der in Bayern geltende Schwellenwert wird deutlich überschritten und in manchen Ländern liegt er noch niedriger. Aus diesem Grund muss das PCR-Protokoll verfeinert werden, um einen Nachweis deutlich unter 20 Sporen pro Korn zu erreichen. Die qualitativen PCR-Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine einzelne Spore nachgewiesen werden kann.

### 3.4 ELISA *U. nuda*

Als zweiter Teil der Arbeit wurde ein ELISA gegen das Gerstenpathogen *Ustilago nuda* (Flugbrand) erarbeitet. Zur Etablierung eines Standardprotokolls konnte zunächst auf einen vorhandenen polyklonalen Antikörper zurück gegriffen werden. Der Antikörper wurde von Dr. Frank Rabenstein vom Julius Kühn-Institut in Quedlinburg bereit gestellt. Als Immunogen diente hier ein Proteinextrakt aus Pilzmycel.

Auf Grund der Biologie des Pathogens wurde zunächst untersucht, welcher Teil des Kornes für einen Nachweis verwendet werden kann. Der Hauptteil des Pilzmycels befindet sich im Scutellum des Kornes, also im Bereich des Embryos. In manchen Fällen wächst das Mycel aber auch im ganzen Korn. Hierfür wurden nur Embryonen verwendet, die wie im Embryotest (vgl. 2.2.4) nach IATA isoliert wurden. Der ELISA wurde nach dem in 2.3.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt, wobei 8 gesunde Embryonen 8 infizierten gegenüber gestellt wurden.

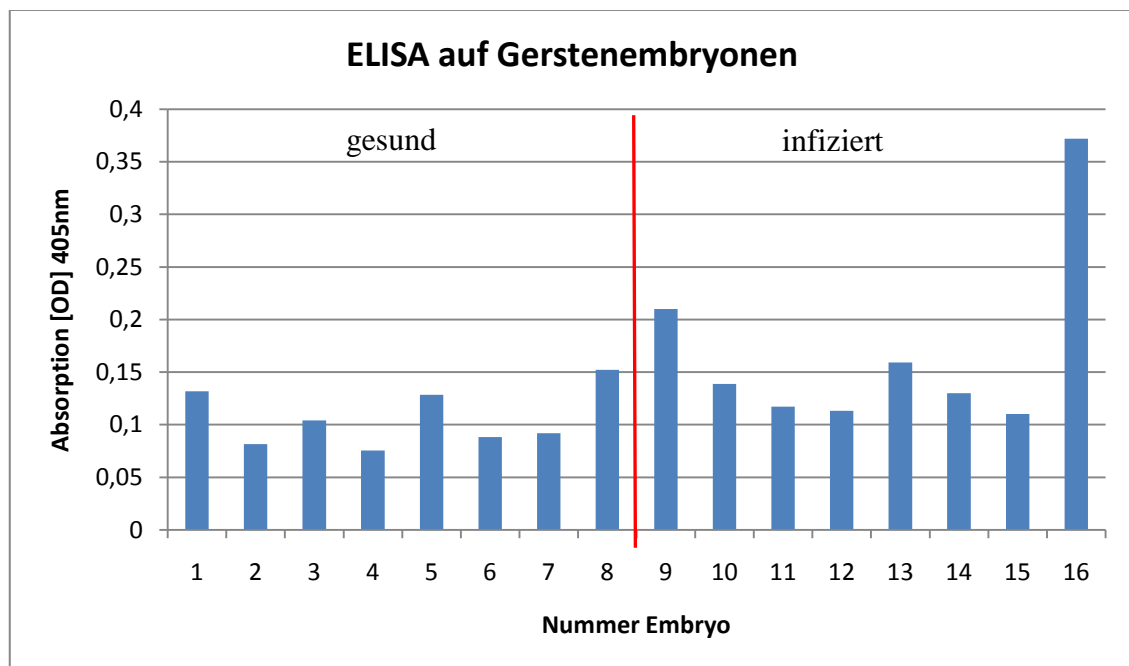


Abb. 45: ELISA auf 8 gesunde (1-8) und 8 infizierte (9-16) Gerstenembryonen unter Verwendung des polyklonalen *U. nuda* Antikörpers.

Den Ergebnissen in Abb. 45 zufolge kann man anhand der isolierten Embryonen keine Aussagen treffen, ob eine Infektion vorliegt oder nicht. Die Absorptionswerte für die befallenen Embryonen liegen im Mittel zwar etwas überhalb der Werte von den gesunden Embryonen, jedoch nicht so signifikant, dass ein Nachweis anhand der isolierten Embryonen möglich wäre. Dies liegt wohl an der Denaturierung der Proteine bei der Isolierung der Embryonen, die 24h in 1M NaOH inkubiert werden.

Als nächster Schritt wurden jeweils gesunde ganze und halbe Körner gegenüber gestellt. Die halben Körner wurden in Embryohälfte und Mehlkörper eingeteilt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob der Mehlkörper einen Einfluss auf das Gesamtergebnis des Nachweises hat. Für die Untersuchung wurde jeweils eine ganze Mikrotiterplatte (80 Körner) verwendet und aus ganzen Körnern, Embryohälften bzw. Mehlkörper die Gesamtheit der Proteine isoliert. Die Arbeitsschritte hierfür und für den anschließenden ELISA sind in den Punkten 2.2.4 und 2.3.5 dargestellt.

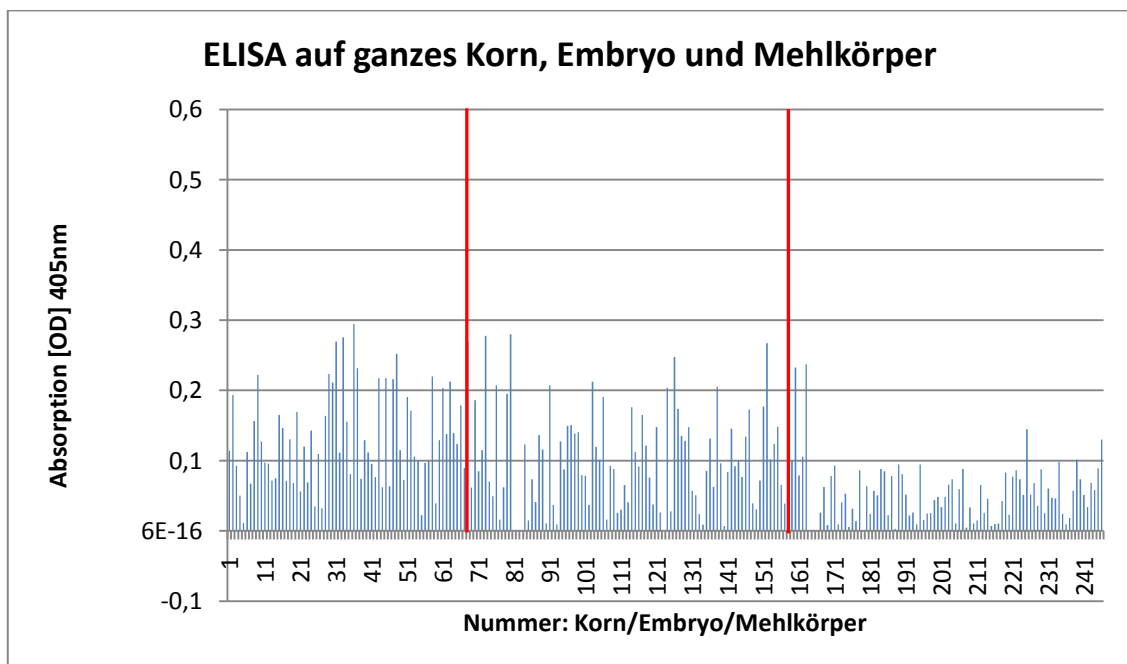


Abb. 46: Graphische Darstellung der Absorptionswerte gesunder Gerstenkörner im ELISA, eingeteilt in: ganzes Korn (1-80), Embryohälfte (84-163) und Mehlkörper (167-246).

Da im Mittelwert keine großen Unterschiede zwischen ganzem Korn (OD = 0,13) und der Embryohälfte (OD = 0,10) bezüglich der Absorptionswerte erkennbar waren, wurde für die folgenden Versuche auf eine Halbierung der Körner verzichtet, um den zeitlichen Aufwand zu verkürzen.

Laut der international akkreditierten Methode nach ISTA Working Sheet No. 48 (Embryotest, vgl. 2.4.1) müssen 2000 Einzelkörner untersucht werden. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurde eine mit *U. nuda* belastete Probe mittels der Standardmethode und mittels ELISA und des polyklonalen Antiserums untersucht. Als Referenz und Negativkontrolle wurden 30 gesunde Gerstenkörner auf dieselbe Art und Weise behandelt und im ELISA eingesetzt. Über alle Absorptionswerte der Negativkontrolle wurde der Mittelwert berechnet und darauf die dreifache positive Standardabweichung addiert. Dieser Wert wurde als Grenzwert angewendet, unter dem die Körner als gesund angesehen werden, alle Absorptionswerte darüber kennzeichnen infizierte Körner.

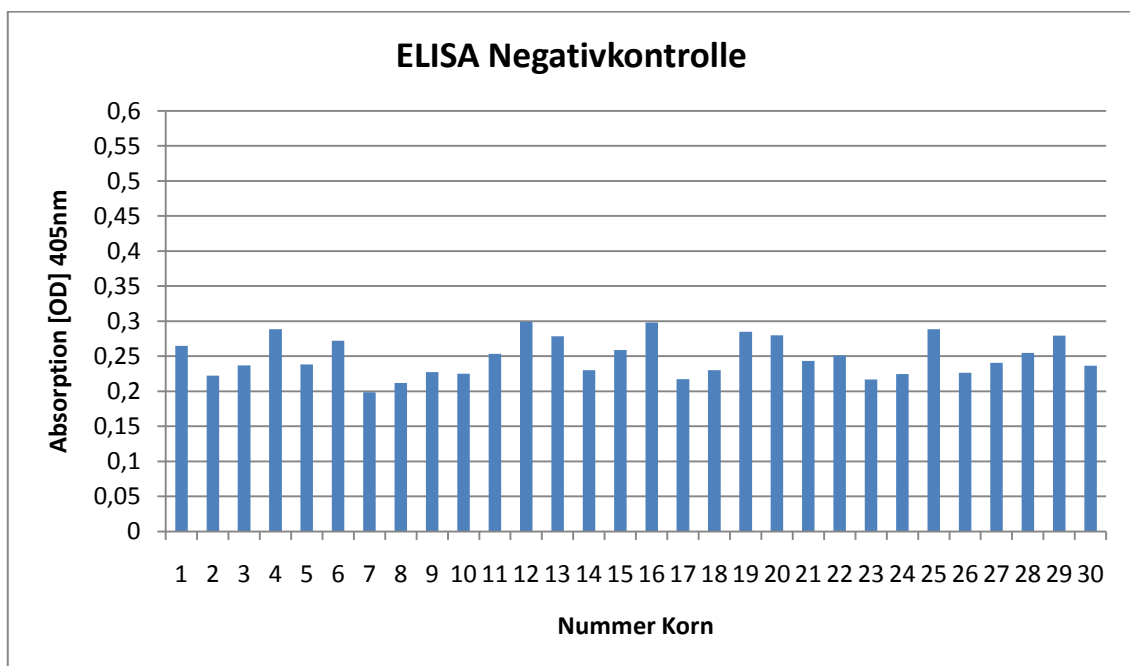


Abb. 47: ELISA der Negativkontrolle mit einem Mittelwert der Absorption von OD = 0,25.

Aus dem errechneten Mittelwert von  $OD = 0,25$  plus der dreifachen positiven Standardabweichung kann ein Grenzwert von  $OD = 0,323$  festgelegt werden.

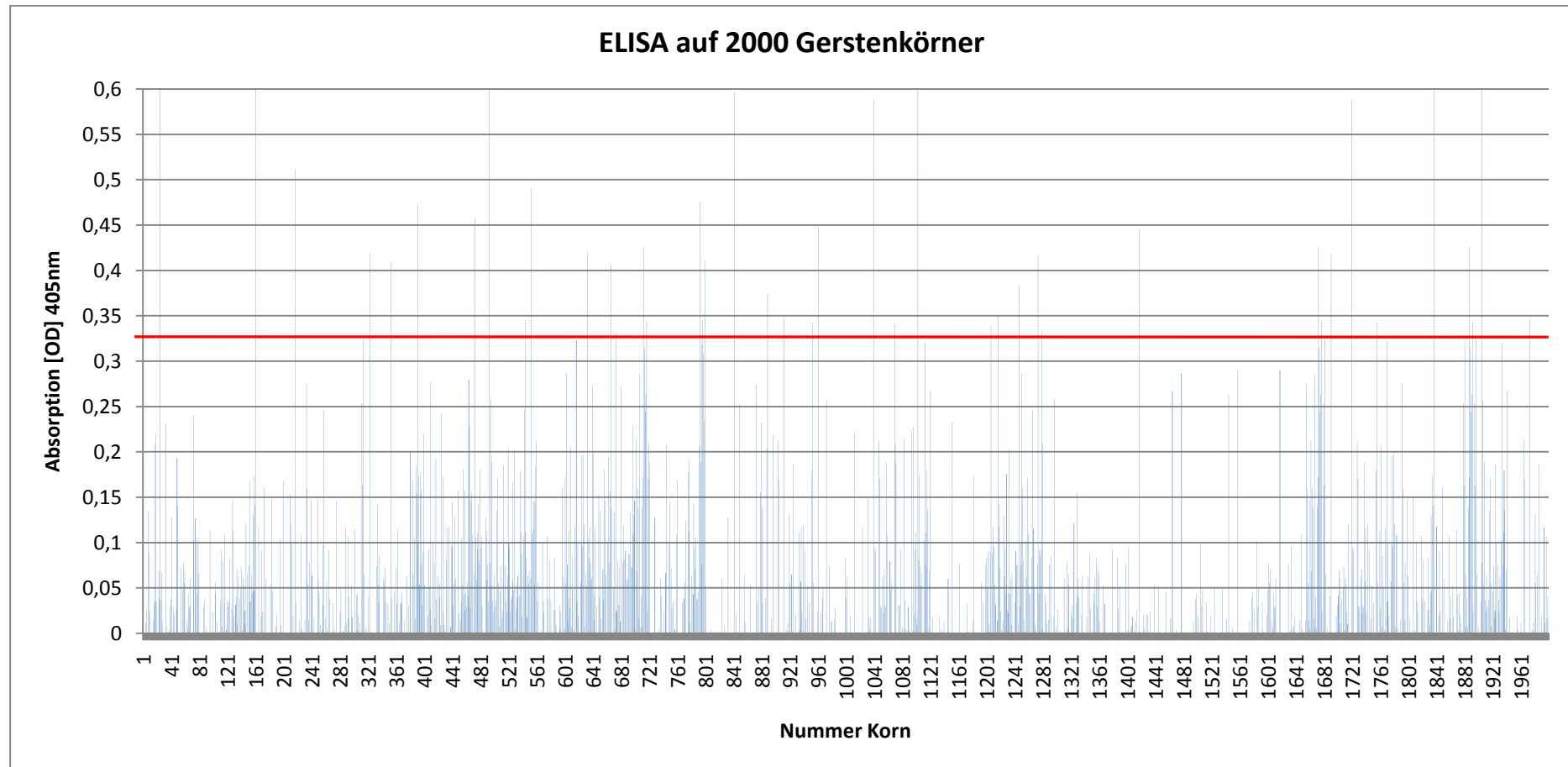


Abb. 48: 2000 untersuchte Gerstenkörner im ELISA unter Verwendung des spezifischen polyklonalen *U. nuda* Antiserums. Die rote Linie kennzeichnet die Höhe des Mittelwerts der Negativkontrolle plus das Dreifache seiner positiven Standardabweichung.

Im Embryotest wurde in dieser Probe ein Befall von 4 % nachgewiesen. Mit 42 infizierten aus 2000 Körnern konnte ein Befall von 4,2 % ermittelt werden. Dieses polyklonale Antiserum stellt also ein gutes Mittel dar, um das Pathogen in Gerstenkörnern nachweisen zu können. Im ELISA traten allerdings auch Wechselwirkungen mit *Ustilago hordei* und *Ustilago tritici* auf (Daten nicht gezeigt). Die Absorptionswerte waren niedriger als für *U. nuda*, können aber trotzdem einen Nachweis beeinflussen. Aus diesem Grund soll für einen spezifischeren Test auf monoklonale Antikörper zurück gegriffen werden.

Während der Versuche hat sich heraus gestellt, dass verschiedene Gerstensorten unterschiedliche Absorptionswerte in der Negativkontrolle ergeben. Ebenso bewirkten unterschiedliche Außentemperaturen Schwankungen bei den Absorptionswerten. Um solchen äußeren Umständen in Praxisanwendungen entgegen zu wirken sollten sich auf jeder einzelne Platte Negativkontrollen befinden, anhand derer der Schwellenwert bestimmt wird.

Die Endlichkeit von polyklonalen Seren bedingt die Herstellung von monoklonalen Seren, die aufgrund der Produktionsweise in Zellkultur gehalten werden können und so neue und **identische** Antikörper gewonnen werden können. Die Planungen und Vorarbeiten für ein solches monoklonales Antiserum sind zum Ende dieser Arbeit durchgeführt worden und eine erste Immunisierung von Mäusen hat bereits statt gefunden. Als Antigen wurde eine Abschwemmung von Oberflächenproteinen aus einer Mycel-Plattenkultur von *U. nuda* verwendet.

Ursprünglich sollten Proteine aus lyophilisiertem Mycel in einem SDS-Gel aufgetrennt und eine spezifische Bande durch Elektroelution isoliert werden. Diese Methode hat nicht ausreichend Proteinkonzentration geliefert, um in einer Immunisierung eingesetzt werden zu können.

Da eine Immunisierung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern wenigstens drei Monate in Anspruch nimmt, können noch keine Ergebnisse hierzu beschrieben



werden. In einem Folgeprojekt wird dieser Antikörper zur Diagnose von *U. nuda* eingesetzt werden.

### **3.5 Ringversuche**

Im Verlauf der Arbeit wurde zum Test der entwickelten Nachweissysteme an zwei internationalen Ringversuchen teilgenommen. Der Veranstalter war in beiden Fällen die ISTA.

#### **3.5.1 Ringversuch *Tilletia***

Im Januar 2008 wurde an dem internationalen Ringversuch „SHCOM Comparative Test – Detection and discrimination of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa*“ teilgenommen. In diesem Ringversuch sollten 5 mit *T. caries* und/oder *T. controversa* infizierte Weizenproben untersucht werden. Gefragt war nach Art und Menge der Infektion. Zu verwenden waren die Methoden nach ISTA Working Sheet No. 53 und/oder eine Hausmethode. Angewendet wurden die entwickelten Antikörper und Primer als Hausmethode. Eine Quantifizierung war für diesen Versuch noch nicht möglich. Der Schwerpunkt lag auf der Praxistauglichkeit der neuen Nachweismethoden.

##### **3.5.1.1 Western Blot-Nachweis**

Von den zu testenden Weizenproben wurden jeweils 300 Körner ausgezählt, in Bechergläser gegeben und mit 60 ml Wasser + 0,1 % TWEEN überschüttet. Mittels Magnetprüher und Rührfisch wurden die Körner für 5 min gewaschen und der komplette Überstand abzentrifugiert. Das zurückbleibende Pellet wurde mit der dreifachen Menge an Glasperlen (0-2mm) vermengt und für 5 min in einem ERG und kleinem Pistill gemörsert, um die Sporen mechanisch aufzuschließen. Nach Zugabe von 500 µl Lämmli-Puffer (vgl. 2.1.2) wurde die Suspension für 5 min bei 95 °C erhitzt und der Überstand mit den gelösten Proteinen konnte weiter verwendet werden. Der nächste Schritt bestand darin, die Proteine nach der Größe in einem SDS Gel aufzutrennen (vgl. 2.3.1). Der Nachweis erfolgte anschließend mittels der spezifischen polyklonalen Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung und über einen an alkalische Phosphatase

gekoppelten Zweitantikörper aus Ziege ( $\alpha$ -Rabbit IgG AP-conjugate) in einer 1:2000 Verdünnung im Western Blot.

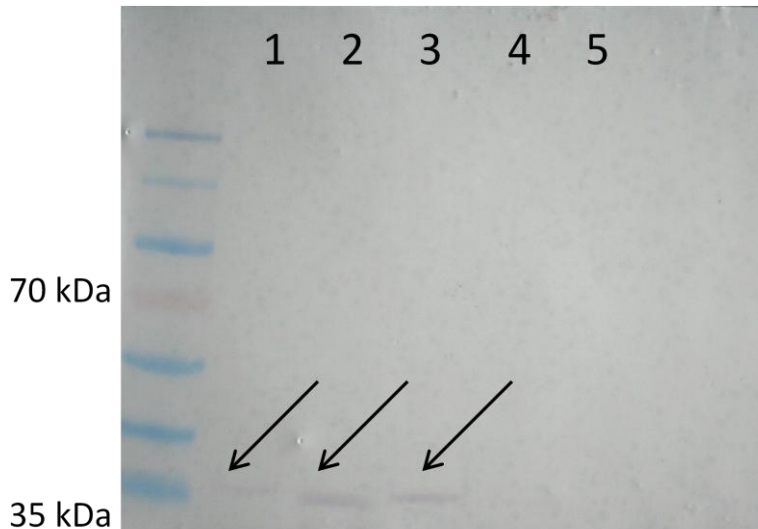


Abb. 49: Ergebnis des Western Blots mit dem spezifischen polyklonalen *T. caries* Antikörper auf 5 Weizenproben. Positive Signale sind mit einem Pfeil markiert.

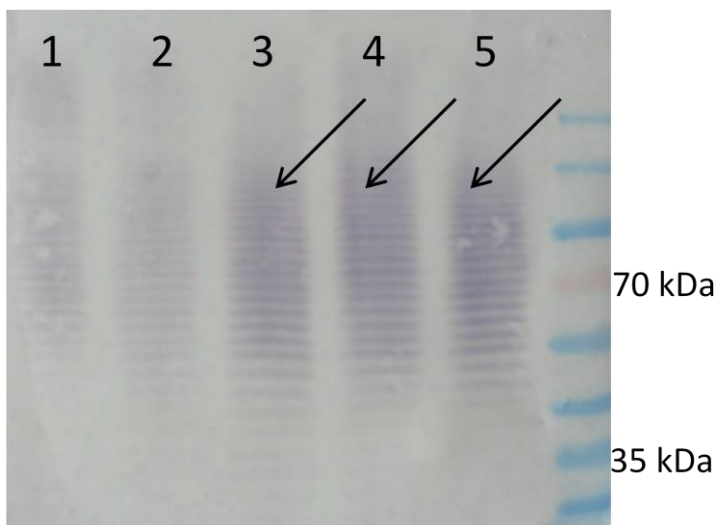


Abb. 50: Ergebnis des Western Blots mit dem spezifischen polyklonalen *T. controversa* Antikörper auf 5 Weizenproben. Positive Signale sind mit einem Pfeil markiert.

Das Ergebnis in Abb. 49 zeigt drei positive Signale (ca. 40 kDa, vgl. 3.1.1.1) für die Proben 1 bis 3. Diese drei Proben sind nach diesen Ergebnissen mit *T. caries* Sporen infiziert. In Abb. 50 zeigen die Proben 3-5 positive Signale für *T. controversa*, aber auch schwächere Wechselwirkungen mit den Proben 1 und 2. Eindeutige Aussagen können hier nicht getroffen werden.

Für das Gesamtergebnis ergibt sich eine *T. caries* Infektion für Proben 1 und 2, eine wahrscheinliche *T. controversa* Infektion für die Proben 4 und 5 sowie eine Mischinfektion der Probe 3. Nach Auswertung des Ringversuches konnte das Gesamtergebnis bestätigt werden.

Die polyklonalen Antikörper konnten sich somit auch in einem Praxistest bewähren und liefern für *T. caries* ein eindeutiges Ergebnis. Im Falle von *T. controversa* liegt es noch im Auge des Betrachters, da die schwächeren Wechselwirkungen mit *T. caries* eine komplett eindeutige Aussage noch nicht zulassen. Zudem stellt dieses System nur ein qualitatives Mittel zur Diagnose dar. Quantitative Aussagen sind erst in einem ELISA unter Verwendung hoch spezifischer monoklonaler Antikörper möglich. Die bereits entwickelten monoklonalen Antikörper bieten diese Anforderung noch nicht, so dass weitere Forschung in diesem Bereich notwendig ist. Ein weiterer Sequenzbereich wurde schon in Punkt 3.2.3 angedeutet und kann zur Herstellung dieser benötigten Antikörper Anwendung finden.

#### 3.5.1.2 PCR-Nachweis

Die Vorbereitung der Proben für den PCR-Nachweis ist identisch zu 3.5.1.1. Nach dem Mörsern wird aus dem Pellet die DNA isoliert und im PCR-Nachweis eingesetzt. Die PCR Bedingungen sind in Punkt 2.2.3.1 angegeben.

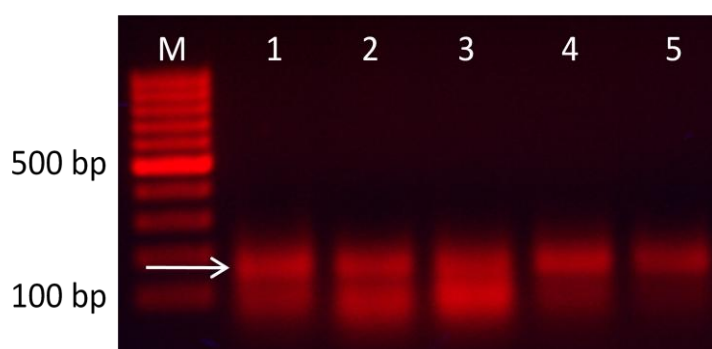


Abb. 51: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für den *Tilletia*-Ringversuch. 1-5 zeigen die 5 Weizenproben an, die mit dem *T. caries* Primerpaar untersucht wurden.

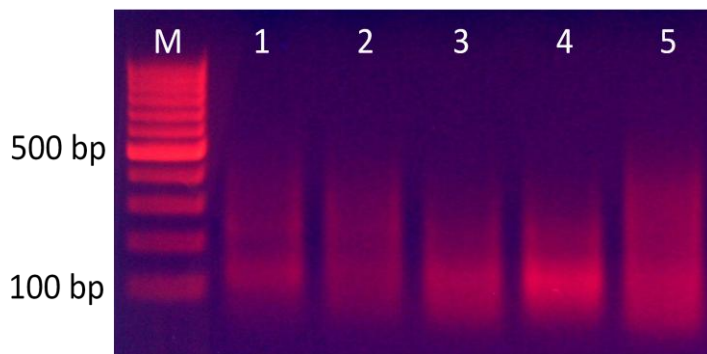


Abb. 52: 1,5%iges Agarosegel mit den Ergebnissen für den *Tilletia* Ringversuch. 1-5 zeigen die 5 Weizenproben an, die mit dem *T. controversa* Primerpaar untersucht wurden.

In den Abb. 51 und 52 sind die Ergebnisse für den *Tilletia* Ringversuch mit dem *T. caries* und dem *T. controversa* Primerpaar dargestellt. Das *T. caries* Primerpaar liefert für alle 5 Proben ein Signal bei ~ 160 bp (Pfeil). Im Gegensatz dazu konnte mit dem *T. controversa* Primerpaar kein Signal auf der erwarteten Höhe von ~ 160 bp erhalten werden.

Für den PCR Nachweis lässt sich zusammenfassen, dass die Proben identisch zur ISTA-Vorschrift vorbereitet wurden, um eine Vergleichbarkeit herzustellen. Die Ergebnisse sind letztendlich uneinheitlich. Obwohl grundsätzlich *T. caries* und *T. controversa* anhand reiner Sporen nachgewiesen und voneinander unterschieden werden können, scheinen von Körnern abgewaschene Sporen ein größeres Problem darzustellen. Die Proben 1-5 sind den Ergebnissen zufolge alle mit *T. caries* infiziert und keine davon mit *T. controversa*. Dieses Ergebnis steht allerdings im Gegensatz zu den Western Blot Ergebnissen und der Auswertung des Ringversuches.

Beim Abwaschen der Körner werden nicht nur reine Sporen gewonnen sondern es wird immer auch Staub, Erdpartikel oder kleinere Bruchstücke z.B. der Spelzen mit abgewaschen. Diese Verunreinigungen sind wohl die Ursache für eine mindere Qualität der DNA zum Einsatz in der PCR oder beeinträchtigen die PCR Reaktion selbst. Für weitere Untersuchungen sollten die Abgewaschenen Sporen in Zukunft aufgereinigt werden, z.B. in einer hoch konzentrierten Zuckerlösung. Wenn dann reine Sporen vorliegen, sollten der Nachweis und die Unterscheidung wieder funktionieren.

### 3.5.2 Ringversuch *U. nuda*

Im Oktober 2008 wurde an dem internationalen Ringversuch *Ustilago nuda* teilgenommen. Hierfür sollten aus 9 Proben jeweils 1000 Einzelkörner mit der Standardmethode nach ISTA Working Sheet No. 48 und/oder einer Hausmethode untersucht werden. Aufgrund des hohen Antikörperverbrauchs wurde nur einmal 1000 Körner mittels ELISA untersucht.

Alle Schritte von Proteinisolierung bis ELISA sind in den Punkten 2.2.4 und 2.3.5 dargestellt. Abbildung 53 zeigt das Ergebnis des Ringversuchs. 19 von 1000 Körner weisen eine Absorption über  $OD = 0,323$  auf (vgl. 3.4) und werden als infiziert angesehen. Dies entspricht einem Befall von 1,9 %. Die offizielle Auswertung dieses Ringversuches hat noch nicht statt gefunden und das Ergebnis kann aus diesem Grund noch nicht überprüft werden.

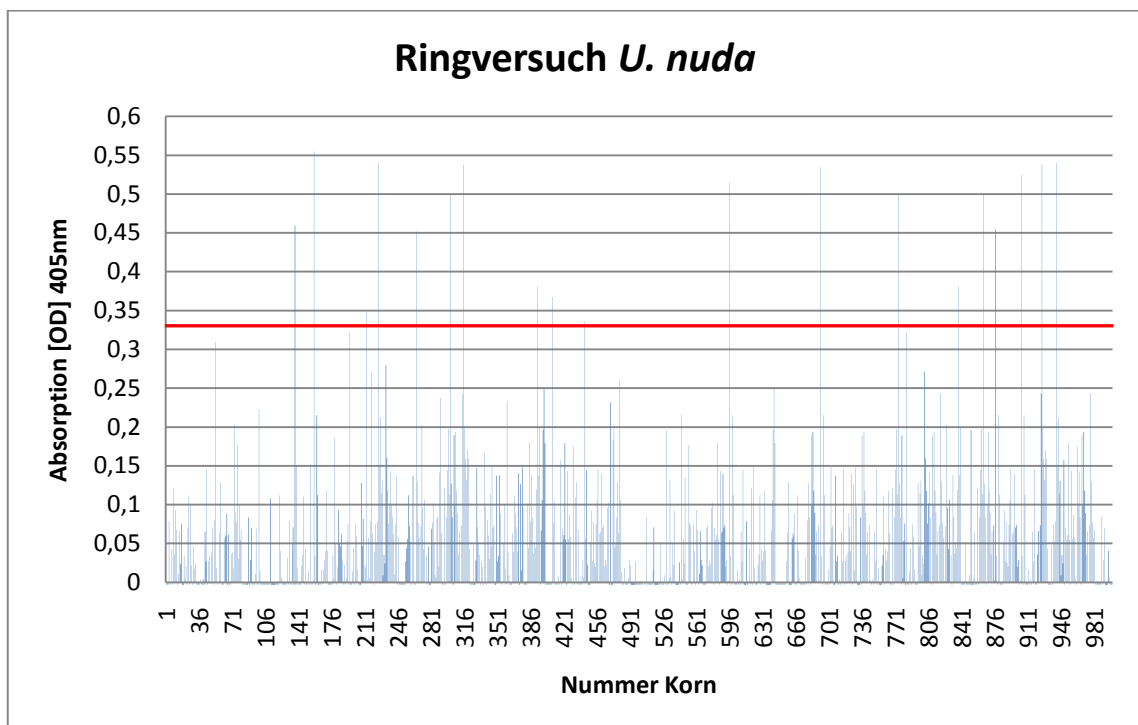


Abb. 53: *U. nuda* Ringversuch mit dem Ergebnis aus dem ELISA unter Verwendung des polyklonalen *U. nuda* Antikörpers. Die rote Linie kennzeichnet die Höhe des Mittelwerts der Negativkontrolle plus das Dreifache seiner positiven Standardabweichung.

Sollte sich das Ergebnis nach der Auswertung des Ringversuches bestätigen, stünde eine sehr gute Methode zum Nachweis von *U. nuda* zur Verfügung. Mit einem Befall von 1,9 % wäre diese Probe allerdings über dem zulässigen Schwellenwert von 0,1 % und könnte somit nicht für die Zulassung als Anbausaatgut freigegeben werden.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Arbeitsschritte gut nachgeköcht werden und bei entsprechender Automatisierung auch beschleunigt durchgeführt werden können. Außerdem fällt die subjektive Meinung des Analytisten beim Mikroskopieren weg, wenn fragwürdige Embryonen einerseits als befallen oder andererseits als gesund interpretiert werden können. Somit wird am Ende ein eindeutiges Ergebnis erzielt. Der Nachteil liegt noch bei einem sehr hohen Antikörperverbrauch. 1 ml Antiserum (Konz. 1 mg/ml) reicht für 2000 Mikrotiterplatten. Wenn 2000 Körner untersucht werden müssen, werden pro Probe 20 Mikrotiterplatten benötigt, somit können nur 100 Proben mit 1 ml Antiserum untersucht werden. Eine Zeitersparnis zur herkömmlichen Methode konnte unter den momentanen Bedingungen nicht erzielt werden.

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Derzeit stehen für die drei *Tilletia*-Arten *T. caries*, *T. controversa* und *T. indica* spezifische Primer zur qualitativen Unterscheidung mittels PCR zur Verfügung (Kellerer *et al.*, 2006, 2007, im Druck). Auf Basis des HSP60 Gens wurden für die Primer Sequenzvergleiche durchgeführt, um die Unterschiede innerhalb der Gene herauszuarbeiten. Für jede *Tilletia*-Art wurde ein Genbereich identischer Position, aber unterschiedlicher Sequenz ausgewählt, der als spezifischer Primer dient. In Verbindung mit einem universellen Primer, mit identischer Sequenz in allen drei *Tilletia*-Arten stehen drei Primerpaare zur Verfügung, die als Ergebnis PCR-Produkte mit einer Länge von 155, 157 und 162 Basenpaaren (bp) erzeugen, mit denen sich spezifisch *T. caries*, *T. controversa* und *T. indica* unterscheiden lassen. Mit den bisher getesteten Sporenherkünften konnten mit dem Testsystem sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Sporenherkünfte aus Bayern, Thüringen, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Baden-Württemberg, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen konnten eindeutig als *T. caries* identifiziert werden. Bei einigen internationalen Sporenherkünften (China, Nordamerika) entstehen derzeit noch vereinzelt „falsch-positive“ PCR-Produkte.

Für eine quantitative Aussage über den Sporenbesatz wurde bereits eine Nachweisgrenze zur Beurteilung der Sensitivität des Testsystems von unter 50 Sporen pro Korn erarbeitet. Wird diese Sporenzahl auf die nach dem ISTA Working Sheet No 53 zu untersuchenden 300 Körner bezogen, so liegt derzeit die Nachweisgrenze bei unter 1 Spore pro Korn, und damit deutlich unterhalb der zulässigen Sporenbelastung von 20 Sporen pro Korn, die für den Anbau von Saatgut im Ökologischen Landbau mit den Verbänden vereinbart wurde. Nach der Verifizierung der Primer soll das bestehende Testsystem weiter entwickelt werden, so dass eine quantitative Aussage (Anzahl Sporen pro Korn) möglich wird. Hierbei kann auf eine entwickelte Standardgerade mit definierten Sporenkonzentrationen zurückgegriffen werden, was aber zu relativ ungenauen Ergebnissen führt. Die Anwendung der Real Time-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern, deren Fluoreszenzintensität sehr genaue Ergebnisse über die Befallsintensität – sprich Anzahl Sporen pro Korn - gibt, ist jedoch hierfür die effektivste und zielführendste Vorgehensweise.

Erste quantitative Ergebnisse mittels Real Time -PCR weisen darauf hin, dass ähnliche Ergebnisse wie bei der qualitativen Methode zu erwarten sind. Die Real Time-Sonden sind zum aktuellen Stand der Forschung spezifisch zu *T. caries* und *T. indica*. Nicht aber zu *T. controversa*. Zudem erreichen diese Sonden noch nicht die Sensitivität, die benötigt wird, um Sporenmengen v.a. um und unter dem Schwellenwert nachweisen zu können. Hierfür ist weitere Forschungsarbeit nötig.

Die Strategie bei den immunochemischen Methoden war zunächst, polyklonale Antikörper mit Sporensuspension als Immunogen herzustellen. Hier wurden zwei Antiseren gegen Steinbrand und Zwergsteinbrand entwickelt, die einen sicheren Nachweis und eine Unterscheidung dieser *Tilletia*-Arten ermöglichen (Kellerer, 2006, 2007, im Druck). Parallel dazu wurde ein Serum gegen *U. nuda* hergestellt.

Die Antikörper gegen *Tilletia*-Arten liefern sehr gute Ergebnisse zum Nachweis im Western Blot. Für den *T. caries*-Antikörper wird eine eindeutige Bande bei ca. 43 kDa angezeigt, für den *T. controversa*-Antikörper eine eindeutige Bande bei ca. 70 kDa, nach Natriumperjodat-Behandlung. Ebenso wie für die PCR-Methode wurde auch hier eine Nachweisgrenze für künftige quantitative Aussagen definiert. Der Antikörper erkennt im Western Blot sogar noch Sporenmengen von 1 µg, was ca. 500 Sporen entspricht. Wird diese Menge wiederum auf 300 Körner bezogen, ergibt sich ein minimal nachweisbarer Befall von unter 2 Sporen pro Korn. Gegen *T. indica* konnte auf diese Weise noch kein Antikörper entwickelt werden.

Für den polyklonalen *U. nuda*-Antikörper ist es jetzt möglich einen Nachweis im ELISA durchzuführen. Die Ergebnisse im Vergleich zur verwendeten ISTA-Methode zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Wie das Ergebnis aus dem internationalen Ringversuch abschneidet, steht noch aus. Trotz hoher Wechselwirkungen mit *U. tritici*, welche eine Unterscheidung zwischen beiden Pilzen nicht möglich macht, stellt diese ELISA-Methode eine Alternative zur herkömmlichen Methode dar. Aufgrund ihrer Biologie ist eine Mischinfektion allerdings fast ausgeschlossen. Sofern die benötigte Antikörpermenge noch reduziert werden kann und/oder die monoklonalen Antikörper ein mindestens gleichwertiges Ergebnis liefern, so wird diese Methode in der Routineuntersuchung Einzug finden.



Generell sind diese polyklonalen Antikörper für einen ELISA noch nicht sensitiv genug, da auch andere Epitope schwach erkannt werden, was zu Wechselwirkungen führen kann. Um dem entgegen zu wirken werden monoklonale Antikörper (mAk) benötigt, mit denen eine visuelle oder ELISA-Reader gestützte Auswertung möglich wird. Durch das Erkennen nur eines einzigen Epitops im Proteom ermöglichen die mAk den spezifischsten und somit sichersten Nachweis.

### **Fazit**

Schnelle, sichere und zuverlässige Untersuchungsmethoden von *Tilletia*- und *Ustilago*-Arten sind zwingend notwendig, da dies mit den bisherigen mikroskopischen Methoden insbesondere bei Vorhandensein von Mischinfektionen nicht immer zutrifft. Mit den herkömmlichen Methoden sind diese Untersuchungen noch immer eine große Herausforderung für die Labore (Eindeutigkeit der Ergebnisse), verbunden mit einem enormen Zeit- und Schulungsaufwand.

Um trotz knapper Personalressourcen Saatgut zeitgerecht untersuchen zu können, ist es zwingend notwendig, diese hocheffizienten biotechnologischen Methoden weiter zu entwickeln, zu validieren und zu etablieren. Denn nur mit diesen Methoden ist in einem Arbeitsschritt eine qualitative und quantitative Aussage über den Sporenbesatz mit *Tilletia*-Arten möglich, bei gleichzeitig hohem Probendurchsatz und geringerem Chemikalienaufwand. Hinzukommt, dass die Untersuchungskosten bei diesen neuentwickelten Verfahren gesenkt werden können.

In Zeiten der Globalisierung, in denen Saatgut zunehmend international gehandelt wird, müssen beim Ex- und Import schnelle und sichere Entscheidungen getroffen werden können, da für Brandkrankheiten in den verschiedenen Ländern unterschiedliche Quarantänebestimmungen gelten.

Mit den bisher entwickelten genomdiagnostischen und immunochemischen Methoden können *Tilletia*-Arten nachgewiesen und voneinander unterschieden werden (qualitativer Nachweis). Diese Ergebnisse wurden auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt und haben großes Interesse bei Wissenschaftlern und

Saatgutspezialisten hervorgerufen (Zielke *et al.*, 2007). Die Entwicklung von quantitativen Nachweismethoden ist zwingend erforderlich, da erst mit der Aussage über die Befallshöhe – sprich die Anzahl Sporen pro Korn – eine sichere Entscheidung darüber getroffen werden kann, ob das entsprechende Saatgut noch anbauwürdig ist. Dies gilt insbesondere für den Ökologischen Landbau.

Die Aufnahme der Methoden in das ISTA Methodenbuch ist das langfristige Ziel, hierzu sind weitere internationale Vergleichsuntersuchungen notwendig.

## 5 ANHANG

### 5.1 Veröffentlichungsliste

Kellerer, T., Sedlmeier, M., Rabenstein, F., Killermann, B. (2006) Entwicklung von immunochemischen und PCR Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia* Arten in Ökosaatgut. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem. 55. Deutsche Pflanzenschutztagung in Göttingen 25.-28. September 2006. ISSN 0067-5849.

Kellerer, T., Sedlmeier, M., Rabenstein, F., Killermann, B. (2006) Development of immunochemical and PCR Methods for Qualitative Detection of *Tilletia* Species in Organic Seeds. Proc. of the XVth Bienial Workshop on the Smut Fungi, Prague, June 11-14. Czech J. Genet. Plant Breed., 42, 2006.

Kellerer, T., Killermann, B. (2007) Entwicklung von immunochemischen und PCR Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia* Arten in Öko-Saatgut. VDLUFA Schriftenreihe Bd. 62/2007, 575-579.

Kellerer, T., Sedlmeier, M., Rabenstein, F., Killermann, B. (2007) Development of immunochemical and PCR Methods for Qualitative Detection of *Tilletia* Species in Organic Seeds. Vortrag auf dem 28 ISTA Seed Symposium, Foz do Iguassu, Brasilien; 05. – 11. Mai 2007

Zielke, N. A.; Killermann, B.; Kellerer, Th. • Weltweites Interesse an Freisinger Steinbrand- Nachweis, <http://www.kompaktzeitung.de/brasilbiotechnologie.html> 2007

Kellerer, T., Killermann, B. (2008) Entwicklung von immunochemischen und PCR Methoden zum qualitativen Nachweis von *Tilletia* Arten in Öko-Saatgut. VDLUFA Schriftenreihe in Vorbereitung.

## 5.2 Marker und Proteinstandards

### DNA-Marker

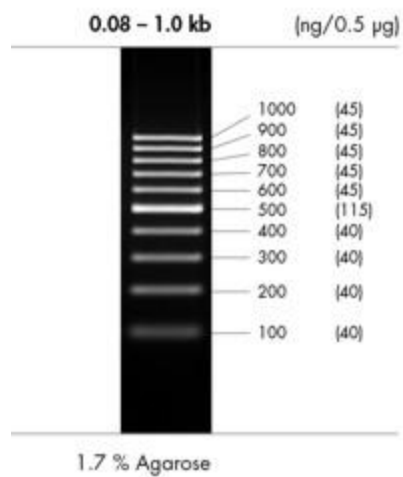


Abb. 54: 100 bp Leiter von Peqlab

### Proteinstandards

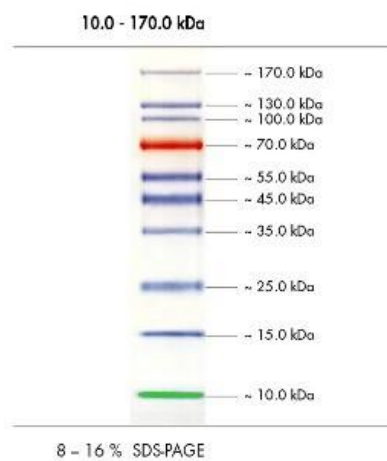


Abb. 55: Prestained Proteinmarker von Peqlab für Western Blot.

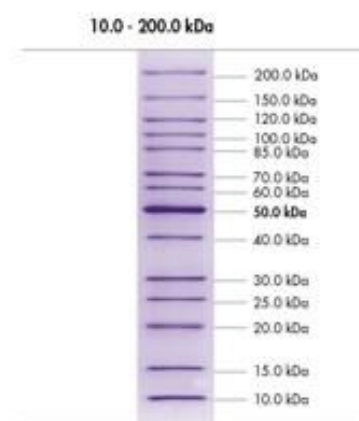


Abb. 56: Proteinmarker von Peqlab für SDS-PAGE.

### 5.3 Weitere Abbildungen

Weitere Abbildungen zu Punkt 3.3.4, Quantifizierung mit der Real Time PCR.

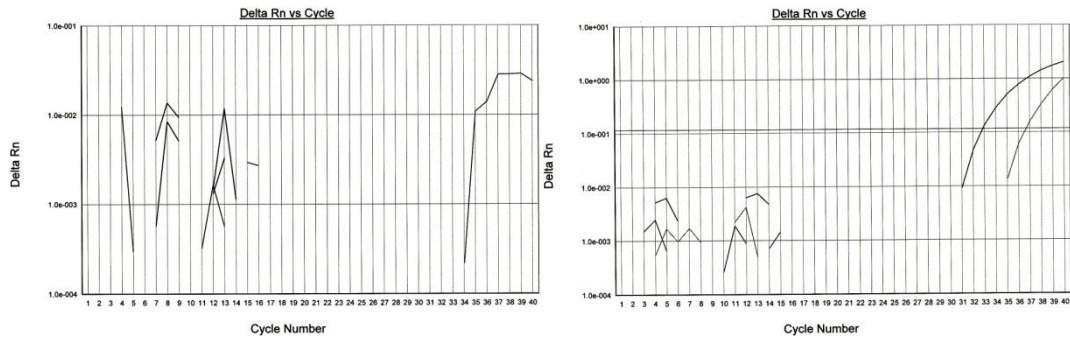


Abb. 57:

links: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. caries* Sonde auf eine *T. controversa* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

rechts: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. caries* Sonde auf eine *T. indica* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

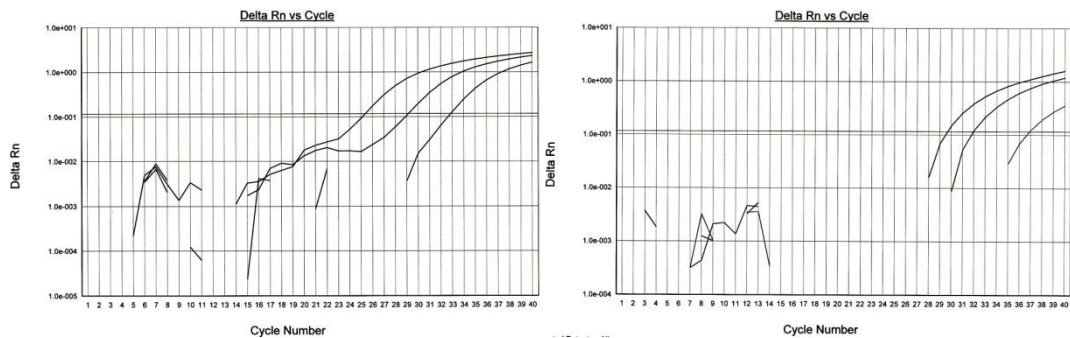


Abb. 58:

links: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. controversa* Sonde auf eine *T. caries* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

rechts: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. controversa* Sonde auf eine *T. indica* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

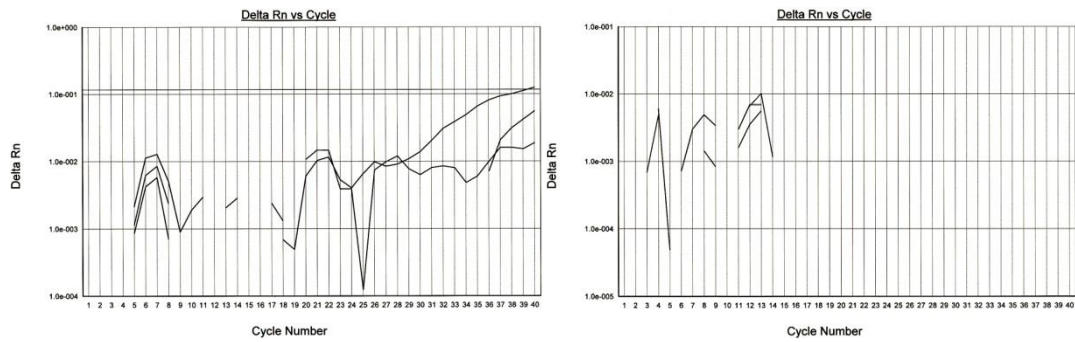


Abb. 59:

links: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. indica* Sonde auf eine *T. caries* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

rechts: Fluoreszenzprofil der spezifischen *T. indica* Sonde auf eine *T. controversa* Probe mit unbekannter Sporenanzahl in Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1.000.

## 6 ABKÜRZUNGEN

∅	Durchmesser
β-ME	Beta-Mercaptoethanol
100bp	100 bp DNA Leiter
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA (engl.: <i>double stranded</i> )
DTT	1,5-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ERG	Eppendorf Reaktions Gefäß
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Quarzbdestilliertes Wasser
HSP	Hitzeschockprotein
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
kV	kilo Volt
ISTA	International Seed Testing Association

l	Liter
LM	Lichtmikroskop
LMW	low molecular weight marker
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
Na <sub>x</sub> H <sub>x</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NC	Nitrozellulose
nm	Nanometer
OD (OD <sub>405</sub> )	Optische Dichte (OD bei 405 nm)
Oligo	Oligonukleotid
p.A.	pro Analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	lat. <i>Potentia Hydrogenii</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)



SG	Sammelgel (SDS-PAGE)
T	Temperatur
<i>T. caries</i> / car	<i>Tilletia caries</i> (Steinbrand)
<i>T. controversa</i> / con	<i>Tilletia controversa</i> (Zwergsteinbrand)
<i>T. indica</i> / ind	<i>Tilletia indica</i> (Indischer Steinbrand)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tech.	technisch
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trenngel (SDS-PAGE)
Tris/HCl	Trihydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
Tween <sup>20</sup>	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	Units
<i>U. hordei</i>	<i>Ustilago hordei</i> (Gerstenhartbrand)
<i>U. nuda</i>	<i>Ustilago nuda</i> (Gerstenflugbrand)
<i>U. tritici</i>	<i>Ustilago tritici</i> (Weizenflugbrand)
ü.N.; ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
Vis	Sichtbar (im Zusammenhang mit UV)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
$\epsilon$	Molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agrios, G.N. (1988): Plant Pathology. Academic Press, London (UK).
- Babadoost, M.; Mathre, D.E. (1998): A Method for Extraction and Enumeration of Teliospores of *Tilletia indica*, *T. controversa* and *T. barclayana* in Soil. Plant Dis. Vol. 82, S. 1357-1361.
- Babadoost, M.; Mathre, D.E.; Johnston, R.H. & Bonde, R.M. (2004): Survival of Teliospores of *Tilletia indica* in Soil. Plant Dis. Vol. 88, S. 56-62.
- Becker, J. Weltzien, H. C. (1993): Bekämpfung des Weizensteinbrandes (*Tilletia caries* (D. C.) Tul. & C. Tul.) mit organischen Nährstoffen. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **100** (1), S. 49-57.
- Bedi, P. S. (1980): Occurrence and prevalence of Karnal Bunt of wheat in the Punjab. Indian Phytopathol. 33(2), S. 249-254.
- Bonde, M. R.; Nester, S. E. (2004): Survival of Teliospores of *Tilletia indica* in Arizona Field Soils. Plant Disease, Vol. 88, No. 8, S. 804-810.
- Burth, U.; Gaber, K.; Jahn, M.; Lindner, K.; Motte, G.; Panzer, S.; Pflaumbaum, J.; Scholze, F. (1991): Behandlung von Saatgut mittels Elektronen – Ein neues Verfahren zur Bekämpfung samenbürtiger Schaderreger an Winterweizen. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes **43** (3), S. 41-45.
- Casper, R.; Meyer, S. (1981): Quantitative serological estimation of a hyperparasite: Detection of *Verticillium lecanii* in yellow rust infected wheat leaves by ELISA. Phytopathologische Zeitschrift **94**, S. 89-91.
- Cherewick, W. J. (1944): An improved method of determining the smut spore load on cereal seed. Canadian Journal of Research Section C, **22**, S. 120-126.

- Churchhill, A. C.; Mills, D. (1984): Kinetics of secondary sporidial production by a wheat-bunt fungus, *Tilletia caries*. Canadian Journal of Botany **62**, S. 129-133.
- Churchward, J. G. (1940): The initiation of infection by bunt of wheat (*Tilletia caries*). Annals of Applied Biology **27**, S. 58-64.
- Clark, M. F.; Adams, A. N. (1977): Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of general Virology **34**, S. 475-483.
- Clark, M. F. (1981): Immunosorbent assays in Plant Pathology. Annual Review of Phytopathology **19**, S. 83-106.
- Dressler, M.; Sedlmeier, M.; Voit, B.; Büttner, P.; Killermann, B. (2008): Erarbeitung von Schwellenwerten zur gezielten Bekämpfung von Zwergsteinbrand (*Tilletia controversa*) und Steinbrand (*Tilletia caries*) sowie deren praktische Umsetzung im Öko-Landbau. 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Zürich. Im Druck. [http://orgprints.org/view/projects/int\\_conf\\_2009\\_wita.html](http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2009_wita.html).
- Eibel, P. (2002): Entwicklung und Erprobung immunologischer und molekulargenetischer Methoden zur Frühdiagnose von *Ustilago nuda* (Jens.) Rostrup und *Tilletia caries* (D. C.) Tul. & C. Tul. In Gerste und Weizen. Der Andere Verlag, Osnabrück. ISBN 3-936231-95-8
- El-Naimi, M.; Toubia-Rahme, H.; Mamluk, O. F. (2000): Organic seed-treatment as a substitute for chemical seed-treatment to control common bunt of Wheat. Eur. J. Plant. Path. **106**, S 433-437.
- Forsberg, G.; Andersson, S.; Johnsson, L. (2002): Evaluation of hot, humid air seed treatment in thin layers and fluidized beds for seed pathogen sanitation. Journal of Plant Diseases and Protection, **109**, S. 357–370.
- Gentner, G. (1976): Eine Methode zum Nachweis der Sporen des Steinbrandes und anderer Pilzarten am Saatgut. Fortschrittliche Landwirtschaft, **4**, S. 353-356.

- Goates, B. J.; Hoffmann, J. A. (1987): Nuclear behavior during teliospore germination and sporidial development in *Tilletia caries*, *T. foetida* and *T. controversa*. Canadian Journal of Botany **65**, S. 512-517.
- Goulter, K.; Randles, J. (1997): Serological and molecular techniques to detect and identify plant pathogens. In: Brown, J.F.; Ogle, H. J. (Hrsg.): Plant pathogens and plant diseases. Rockvale Publications, Armidale (AUS).
- Hansen, F. (1958): Anatomische Untersuchungen über Eindringen und Ausbreitung von *Tilletia*-Arten in Getreidepflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wirtspflanze. Phytopathologische Zeitschrift **34**, S. 169-208.
- Hoffmann, G. A.; Schmutterer, H. (1999): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Hökeberg, M.; Gerhardson, B.; Johnsson, L. (1997): Biological Control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse-selected bacteria. European Journal of Plant Pathology **103**, S. 25-33.
- ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 48
- ISTA Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 53
- Jahn, M., Koch, E., Wächter, R. & Waldow, F. (2003) Saatgutgesundheit im ökologischen Landbau – Schwerpunkt Weizensteinbrand (*Tilletia caries*). Ressortforschung für den ökologischen Landbau 2003; Statusseminar 5. März 2004, BBA, Kleinmachnow.
- Johnsson, L. (1973): Dvärgstinksot (*Tilletia controversa*) och vanligt stinksot (*Tilletia caries*) i svenskt Vete. Vaxtskyddrapporter **6**, 1–19. (Abstract).
- Kietreiber, M. (1976): Zur Feststellung der Sporen von *Tilletia* Arten im Saatgut (Filtrationsverfahren mit Zellulosenitrat-Blättchen). Jahrbuch 1975 der Bundesanstalt für Pflanzenbau und Samenprüfung in Wien, S. 95-102, Eigenverlag.

- Koch, E.; Spieß, H. (2002): Characterisation of leaf symptoms of common bunt (*Tilletia caries*) and relationship to ear attack in nine wheat varieties. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **109**, S. 159-165.
- Kumar, J.; Nagarajan, S. (1998): Role of Flag Leaf and Spike Emergence Stage on the Incidence of Karnal Bunt in Wheat. *Plant Disease*, Vol. 82, No. 12, S. 1368-1370.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Levi, L.; Castlebury, L. A.; Carris, L. M.; Meyer, R. J.; Pimentel, G. (2001): Internal Transcribed Spacer Sequence-Based Phylogeny and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Differentiation of *Tilletia walkeri* and *T. indica*. *Phytopathology* **91**(10), S. 935-940.
- Malik, M. M. S.; Batts, C. C. V. (1960a): The infection of Barley by Loose Smut (*Ustilago nuda* (Jens) Rostr.). *Transactions of the British Mycological Society* **43** (1), S. 117-125.
- Malik, M. M. S.; Batts, C. C. V. (1960b): The Development of Loose Smut of Barley (*Ustilago nuda*) in the Barley Plant, with observations on Spore Formation in Nature and in Culture. *Transactions of the British Mycological Society* **43** (1), S. 126-131.
- McDonald, J. G.; Wong, E.; Kristijansson, G. T.; White, G. P. (1999): Direct amplification by PCR of DNA from ungerminated teliospores of *Tilletia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology* **21**, S. 78-80.
- Miller, S. A.; Martin, R. R. (1988): Molecular diagnosis of Plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **26**, S. 409-432.
- Neergaard P. (1977): *Seed Pathology*. The Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke, Vol. I and II.

- Paffrath, A.; Tränkner, A. (1998): Weizensteinbrand – Bekämpfung im ökologischen Landbau. *Lebendige Erde* 5, S. 431-434.
- Pedersen, P. N. (1956): Infection of barley by loose smut, *Ustilago nuda* (Jens.) Rostup. *Friesia* 5, S. 341-348.
- Pirson, H. (1977): Die Bestimmung von Stein- und Hartbrandsporen in Getreidesaatgut. *Landwirtschaftliche Forschung, Sonderheft 33/II, Kongressband 1976*, S. 202-207.
- Pirson, H. (1978): A simple method for the detecting of bunt and covered smut spores as contaminants on cereal seeds. Working group on temperate climate cereals. In the report on the sixteenth International Workshop on Seed Pathology. ISTA-PDC, S. 54-57. Mimeograph, Karlsruhe.
- Sansford, C.; Baker, R.; Brennan, J.; Ewert, F.; Gioli, B.; Inman, A.; Kelly, P.; Kinsella, A.; Leth, V.; Magnus, H.; Miglietta, F.; Murray, G.; Peterson, G.; Porta-Puglia, A.; Porter, J.; Rafoss, T.; Riccioni, L.; Thornes, F. & Valvassini, M. (2006): Deliverable Report DL 6.1. Report on the risk of entry, establishment and economic loss for *Tilletia indica* in the European Union. EC Fifth Framework Project QLKS-1999-01554 Risks Associated with *Tilletia indica*, the Newly Listed EU Quarantine Pathogen, the Cause of Karnal Bunt of Wheat [<http://karnal-public.pestrisk.net/>].
- Schwab, F. (2007): Swiss Confederation Federal Department of Economic Affairs DEA Agroscope Reckenholz-Tänikon Research Station, ART; Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich; <http://www.reckenholz.ch>.
- Smiley, R. W. (1997): Risk Assessment for Karnal Bunt Occurrence in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, Vo. 81, No. 6, S. 689-692.
- Smith, O. P.; Peterson, G. L.; Beck, R. J.; Schaad, N. W.; Bonde, M. R. (1996): Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of karnal bunt of wheat. *Phytopathology* 86 (1), S. 115-122.

- Sorauer, P. (1962): Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Band III, 4. Lieferung, S. 466-525. Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Spieß, H.; Dutschke, H. (1991): Bekämpfung des Weizensteinbrandes (*Tilletia caries*) im Biologisch - Dynamischen Landbau unter experimentellen und praktischen Bedingungen. Gesunde Pflanzen **43**, S. 264-270.
- Spieß, H.; Koch, E. (2004): Wirkung des Pflanzenstärkungsmittels TILLECUR® auf sautgutübertragbare Krankheiten des Getreides unter den Bedingungen des Öko-Landbaues. 54. Deutsche Pflanzenschutztagung, Mitt. BBA 396; S. 504-505.
- Stein, J. M.; Maples, H. W.; Rush, C. M. (2005): Epidemiology of *Tilletia indica* Teliospores in Regulated Wheat Fields in Texas. Plant Disease, Vol. 89, No. 8, S. 828-833.
- Stockwell, V. O.; Trione, E. J. (1986): Distinguishing Teliospores of *Tilletia controversa* from Those of *Tilletia caries* by Fluorescence Microscopy. Plant Disease, Vol. 70, No. 10, S. 924-926.
- Swinburne, T. R. (1963): Infection of wheat by *Tilletia caries* (DC.) Tul., causal organism of bunt. Transactions of the British Mycological Society **46** (1), S. 145-156.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Bd. **76**, S. 4350-4354.
- Trione, E.J. & Krygier, B.B. (1997): New Tests to Distinguish Teliospores of *Tilletia controversa*, the Dwarf Bunt Fungus, from Spores of Other *Tilletia* Species. Phytopathology **67**: S. 1166-1172.
- Voit, B.; Killermann, B. (2007): Steinbrand (*Tilletia caries*) bei Weizen – Neueste Ergebnisse aus einem Praxisversuch. VDLUFA Schriftenreihe Bd. 62/2007, S. 573-574.

Winter, W.; Bänzinger, I.; Krebs, H.; Rügger, A.; Frei, P.; Gindrat, D. (1994);  
Warmwasserbehandlung von Weizensaatgut. Agrarf. **1** (11/12), S. 492-495.

Woodward, M.; Young, Jr. W.; Bloodgood R. (1985) Detection of monoclonal  
antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J  
Immunol Methods, Vol. 78, S. 143–153.

Zielke, N. A.; Killermann, B.; Kellerer, Th. (2007). Weltweites Interesse an Freisinger  
Steinbrand-Nachweis, <http://www.kompaktzeitung.de/brasilbiotechnologie.html>



## Acknowledgements

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Berta Killermann für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen, sowie für ihre Anregungen zu den Experimenten, wie auch für ihr Engagement, welches mir den Aufenthalt in Brasilien ermöglicht hat.

Ein großer Dank geht an Prof. Bertold Hock und meinem Doktorvater Dr. Karl Kramer die mir sehr viel Geduld entgegengebracht und besonders am Anfang die Arbeit mit wichtigen Tipps und Anregungen in die richtige Bahn gelenkt haben.

Ein Dank geht auch an Herrn Dr. Frank Rabenstein ohne dessen Hilfe im weiten Feld der Antikörper vieles während der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie die angenehmen Besuche in Aschersleben und Quedlinburg mit komisch klingenden Biersorten werden mir noch lange in Erinnerung bleiben.

Helga Gruber und möchte ich noch danken für längere Diskussionen in der Molekularbiologie und manche Kniffe im Labor, die das Leben erleichtert haben. Ebenso möchte ich mich bei Markus Dressler bedanken, der mir am Ende der Arbeit noch bei den klassischen Themen der Landwirtschaft mit auf die Sprünge geholfen hat und mir immer gerne in der Mittagspause Gesellschaft geleistet hat.

Diese Arbeit wäre nicht zustande gekommen ohne die Hilfe in den Experimenten von Monika Sedlmeier. Die Stunden und Tage bei der Bonitur der Weizen- und Gerstenfelder sowie das Gießen einer unzählbaren Menge an Protein und DNA-Gelen haben mir geholfen den Blick auf das Wesentliche lenken zu können. Auch ihren Grillabenden gilt mein Dank. Sie haben die Gruppe auch außerhalb der Arbeit zu Freunden gemacht.

Auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre am Institut. In meinen Augen ist dies etwas ganz Besonderes.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Eltern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.