

**Entwicklung schneller Verfahren zur DNA-gestützten Detektion von
Fusarien und Analyse ihrer Mykotoxinbildung**

Alexandra Knoll

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 (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Engel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

Die Dissertation wurde am 09.08.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 17.10.2002 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
° C	Grad Celsius
μ	Mikro
AcDON	Acetyldeoxynivalenol
a _w	Wasseraktivität
bp	Basenpaare
BSA	Albumin, bovin
bw	body weight
cDNA	copy DNA
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
DON	Deoxynivalenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphate
EBC	European Brewery Convention
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KCl	Kaliumchlorid
M	molar
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
NIV	Nivalenol
IARC	International Agency for Research on Cancer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
pH	pondus hydrogenii; $a(\text{H}_3\text{O}^+)$: Aktivität der Hydronium-Ionen
ppb	Parts per Billion ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
RT	Reverse Transkriptase
t-	temporary
TDI	total daily intake
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation
ZEA	Zearalenon

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung und Vorkommen von Fusarium-Arten	1
1.2. Mykotoxine	2
1.3. Fusarium- Toxine	3
1.3.1. Fumonisine	3
1.3.2. Zearalenon	5
1.3.3. Trichothecene	5
1.3.3.1. T-2 Toxin/HT-2 Toxin	8
1.3.3.2. Deoxynivalenol (DON)	10
1.4. Biosynthese der Trichothecene	13
1.5. Gushing	15
1.6. Detektion von Fusarium-Arten mit molekularbiologischen Methoden	16
1.7. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Materialien	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.1.1. HPLC	18
2.1.1.2. Sonstige Geräte	18
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	20
2.1.2.1. Chemikalien	20
2.1.2.2. Stammlösungen	20
2.1.2.3. Verwendete Kulturmedien	22
2.1.3. Untersuchungsmaterial	24
2.1.4. Oligonukleotidsequenzen	25
2.1.5. Mikroorganismen	26
2.1.6. Verwendete DNA-Isolate	27
2.2. Methoden	28
2.2.1. Extraktionsverfahren für Pilz-DNA aus Getreide- und Malzproben	28
2.2.1.1. Optimierung des Verfahrens	28
2.2.1.2. Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode	28
2.2.2. Versuche zur Probenahme	28
2.2.3. PCR-Protokolle	29
2.2.3.1. Einzel-PCR- Protokolle	29
2.2.3.2. Triplex-PCR	30
2.2.3.3. Rapidcycler-PCR	31
2.2.3.4. PCR-Protokoll zur Detektion von <i>F. graminearum</i> mit markierten Primern ..	32
2.2.4. Detektion von PCR-Produkten im Agarosegel	32
2.2.5. Detektion von PCR-Produkten mittels DNA Detection Test Strips™	32
2.2.6. Strand Displacement Amplification (SDA)	33
2.2.6.1. Reaktionsansatz 1 mit Ava I und exo ⁻ -Klenow-Fragment	34
2.2.6.2. Reaktionsansatz 2 mit BsoB1 und Bst ⁻ -Polymerase	35
2.2.6.3. Variationen der Puffersysteme ausgehend vom 2. Reaktionsansatz	35

2.2.6.4. Variation der Inkubationszeiten und -temperaturen ausgehend vom 2. Reaktionsansatz.....	36
2.2.7. Variation von Kultivierungsbedingungen zur Analyse der Mykotoxinbildung und Genexpression	36
2.2.7.1. Test von <i>F. culmorum</i> und <i>F. graminearum</i> auf Mykotoxinbildung	36
2.2.7.2. Versuche zur Auswahl von geeigneten Kultivierungsmedien	37
2.2.7.3. Versuche zum Vergleich der Expression des Tri5-Gens mit der Mykotoxinbildung.....	37
2.2.8. Qualitative Analyse von Mykotoxinen mittels Dünnschichtchromatographie	38
2.2.8.1. Extraktion von Mykotoxinen aus Kulturüberstand für die Dünnschichtchromatographie.....	38
2.2.8.2. Durchführung der Dünnschichtchromatographie.....	38
2.2.9. Quantitative Analyse von Mykotoxinen mittels HPLC	38
2.2.9.1. Extraktion von Mykotoxinen aus Kulturüberstand für die HPLC	38
2.2.9.2. Durchführung der HPLC-Analyse	39
2.2.10. RNA-Extraktion aus Pilz-Myzel	39
2.2.10.1. Vorbereitung der Materialien/Lösungen	39
2.2.10.2. Durchführung der RNA-Extraktion	40
2.2.10.3. DNase-Verdau von RNA-Proben.....	40
2.2.11. Quantitative RT-PCR	41
2.2.11.1. Durchführung der RT-Reaktion	41
2.2.11.2. Quantitative PCR.....	41
3. Ergebnisse.....	43
3.1. DNA-Extraktionsverfahren für Fusarium-Arten aus Getreide und Malz	43
3.1.1. Optimierung des DNA-Extraktionsverfahrens.....	43
3.1.2. Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens	44
3.2. Einsatz des Extraktionsverfahrens an Getreideproben.....	44
3.3. Untersuchungen zur Probenahme in Getreide für die PCR-Analytik.....	45
3.4. Entwicklung einer Triplex-PCR	45
3.4.1. Sensitivität der Triplex-PCR	46
3.4.2. Spezifität der Triplex-PCR.....	47
3.4.3. Anwendung der Triplex-PCR in mit <i>Fusarium</i> -Arten kontaminiertem Weizen ...	49
<i>F. graminearum</i>	49
3.4.4. Vergleich von PCR-Resultaten mit DON-Konzentrationen in Weizen	50
3.5. Entwicklung einer Rapidcycler-PCR	51
3.6. Strand Displacement Amplification	51
3.7. Einsatz von DNA Detection Test Strips™ zur Detektion von <i>F. graminearum</i>....	52
3.7.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	52
3.7.2. Sensitivität der DNA Detection Test Strips™	53
3.7.3. Anwendung der Test Strips™ an DNA aus kontaminiertem Getreide	54
3.8. Vergleich der mit PCR nachgewiesener Fusarium-Kontamination und dem Gushing-Test.....	55
3.9. Analyse der Mykotoxinbildung und Vergleich mit der Genexpression des Tri5-Gens	56
3.9.1. Einfluss von Kulturmedien auf die Mykotoxinbildung.....	56
3.9.2. Screening von <i>Fusarium</i> -Stämmen auf Mykotoxinbildung.....	59
3.9.2.1. Mykotoxinbildung bei <i>F. culmorum</i>	59

3.9.2.2. Mykotoxinbildung bei <i>F. graminearum</i>	62
3.9.3. Quantifizierung von mRNA im LightCycler™	68
3.9.3.1. Auswahl geeigneter PCR-Reaktionen.....	68
3.9.3.2. Analyse der Schmelzkurven im LightCycler™	70
3.9.3.3. Kalibrationskurve zur Quantifizierung von DNA.....	72
3.9.4. Vergleich Mykotoxinbildung und Expression des Tri5-Gens.....	73
3.9.4.1. Untersuchungen mit <i>F. graminearum</i> TMW 4.0122	74
3.9.4.2. Untersuchungen mit <i>F. culmorum</i> TMW 4.0754.....	76
4. Diskussion.....	81
4.1. Extraktionsverfahren für Fusarium-DNA aus Getreide und Malz.....	81
4.1.1. Optimierung des Verfahrens	81
4.1.2. Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens	83
4.1.3. Anwendung des Extraktionsverfahrens an Getreideproben.....	84
4.2. Probenahme aus Getreide für die PCR-Analytik.....	84
4.3. Schnelle Verfahren zur DNA-gestützten Detektion von Fusarium-Arten.....	85
4.3.1. Entwicklung einer Triplex-PCR.....	85
4.3.1.1. Sensitivität der Triplex-PCR.....	86
4.3.1.2. Spezifität der Triplex-PCR.....	87
4.3.1.3. Einsatz der Triplex-PCR zur Untersuchung von mit <i>Fusarium</i> -Arten kontaminiertem Weizen	87
4.3.1.4. Triplex-PCR-Resultate im Vergleich mit DON-Konzentrationen von Getreide	88
4.3.2. Einsatz einer Rapidcycler-PCR.....	89
4.3.3. Strand Displacement Amplification (SDA)	89
4.3.4. Anwendung von DNA Detection Test Strips™ zur Detektion von <i>Fusarium</i> -Arten	91
4.4. Vergleich von PCR-Resultaten mit dem Gushing-Test	92
4.5. Analyse der Mykotoxinbildung.....	93
4.5.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Genexpression des Tri5-Gens.	93
4.5.2. Beeinflussende Faktoren der Mykotoxinbildung.....	95
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis	102

1. Einleitung

1.1. Bedeutung und Vorkommen von *Fusarium*-Arten

Schimmelpilze im Allgemeinen und *Fusarium*-Arten im Speziellen sind aufgrund ihrer breiten Anpassungsfähigkeit weltweit in unterschiedlichsten Ökosystemen verbreitet. Von den *Fusarium*-Arten wird aufgrund ihrer grossen Diversität vermutet, dass sie sehr früh in der Evolution der Ascomyceten entstanden sind (Backhouse *et al.* 2001). *Fusarium*-Arten kommen als Boden-Saprophyten vor und haben als Erreger von Pflanzenkrankheiten eine weltweite Bedeutung (Wurzel- und Stengelfäule, Blattflecken, Fruchtfäule, Krebswucherungen, Gefäßkrankheiten). Der Befall von Getreidepflanzen wie Weizen und Gerste (*Fusarium* Head Blight), Mais (ear and stalk rot) (Desjardins 2000) und Reis führt weltweit zu grossen ökonomischen Verlusten (Bai und Shaner 1994, Paulitz 1999).

Fusarium-Arten sind Feldpilze, die sich aber auch bei der Lagerung ausbreiten können, wenn die Bedingungen ein Wachstum ermöglichen. Der Befall von Getreide auf dem Feld wird durch eine feucht-warme Witterung (über 20 °C) während der Vegetationsperiode begünstigt. Als Auswirkungen auf die Pflanzen sind Fuß-, Stengel-, Ähren-, Kolben- und Rispenkrankungen sowie Schäden an Keimlingen zu beobachten.

Unter dem Begriff '*Fusarium* Head Blight', auch Scab (USA) und Weissährickeit genannt, versteht man eine Krankheit, die vor allem bei Weizen aber auch bei Gerste und Hafer auftritt und von verschiedenen *Fusarium*-Arten ausgelöst wird (Sutton 1982, Parry *et al.* 1995, Paulitz 1999). Der Pilz überlebt den Winter auf den abgestorbenen Resten von Weizen oder Mais, um dann in der folgenden Saison die neuen Pflanzen zu befallen. Dabei spielt bei vielen Arten die Verbreitung von Ascosporen durch den Wind und im Spritzwasser eine grosse Rolle. Die Erkrankung hängt vor allem von der Temperatur und der Feuchtigkeit zur Zeit der Blüte ab. *F. graminearum* zeigt ein Wachstumsoptimum bei 25°C und wächst bis zu einem minimalen a_w -Wert von 0,88. *F. culmorum* wächst optimal bei 21°C und bis zu einem minimalen a_w -Wert von 0,87. Diese Werte begründen die regionale Verteilung dieser beiden Organismen. *F. graminearum* kommt eher in wärmeren und *F. culmorum* eher in kühleren Regionen vor (Miller 1995). Die befallenen Körner sind klein, weißlich und verkümmert. Aber auch Körner ohne äussere Auffälligkeiten können befallen sein. Neben den entstehenden Ertragsverlusten und Qualitätseinbußen ist vor allem das mögliche Vorhandensein von Mykotoxinen von grosser Bedeutung.

1.2. Mykotoxine

Schimmelpilze haben die Menschheit von je her begleitet und die Menschen wussten von den damit verbundenen Gefahren. Im Mittelalter wird von epidemieartigen Vergiftungen berichtet, die durch *Claviceps purpurea*, dem Mutterkornpilz ausgelöst wurden. In Russland wurde im 19. Jahrhundert von Todesfällen berichtet, die nach dem Verzehr von Brot auftraten. Das entsprechende Getreide war den Winter über auf dem Feld und wurde von *Fusarium*-Arten, wahrscheinlich *F. sporotrichoides* oder *F. langsethiae* sp. nov. befallen. Seit dem 19. Jahrhundert fielen Tausende von Menschen der 'Alimentären Toxischen Aleukie' zum Opfer (Moss und Smith 1985).

Die ersten Bemühungen, Forschung an Mykotoxinen zu betreiben, wurden aufgrund der 'Turkey X'-Krankheit unternommen. In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts starben in England 100 000 Truthühner, 14 000 Enten und Tausende Fasane, Rebhühner und Forellen, die Leberkarzinome aufwiesen. Als Auslöser konnten Aflatoxine im Futter ausgemacht werden, die von *Aspergillus flavus* produziert wurden. Zwischen 1930 und 1970 wurden in den USA Ausbrüche von Leukoencephalomalazie bei Pferden beobachtet (Hasseltine und Mehlman 1978). Als Auslöser hierfür konnte später *Fusarium moniliforme* ausgemacht werden.

Mykotoxine sind Metabolite des Sekundärstoffwechsels, die von bestimmten filamentösen Pilzen produziert werden. Mehr als 400 solcher toxischer Substanzen sind bekannt, wobei nur ein kleiner Teil in Nahrungs- oder Futtermitteln auftritt. Die Hauptproduzenten sind *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* und *Claviceps*.

Einen Überblick über die Vielfalt der von ihnen gebildeten Toxine bietet Tabelle 1.

Tabelle 1: Mykotoxinproduzenten und ihr Vorkommen

Gattung	Mykotoxine	Vorkommen	Wirkung
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine Ochratoxin A Sterigmatocystin	Mais, Erdnüsse Getreide, Kaffee Getreide	mutagen, cancerogen, Leberschäden cancerogen, Nierengift lebertoxisch
<i>Penicillium</i>	Ochratoxin A Citrinin Patulin	Reis, Getreide Getreide, Obst	Nierengift Ödeme, Immunsuppression
<i>Fusarium</i>	Trichothecene Zearalenone Fumonisine Moniliformin	Getreide, Mais Getreide, Soja Getreide, Mais Mais, Obst	(siehe unten) östrogene Wirkung neurotoxisch, cancerogen stark toxisch
<i>Alternaria</i>	Alternariol	Ölfrüchte	mutagen, Speiseröhrenkrebs
<i>Claviceps</i>	Ergotalkaloide	Getreide	Halluzinationen, Nervenschäden

Die Schimmelpilze sind auf sehr vielen verschiedenen und wichtigen Nahrungsmittelrohstoffen vorhanden und eine Kontamination der Lebensmittel oder des Futters mit Mykotoxinen ist nicht auszuschließen (Prelusky 1994, Smith *et al.* 1994, Bullerman 1995, Smith und Thakur 1995, Webley *et al.* 1997, Sweeney 1998).

1.3. Fusarium- Toxine

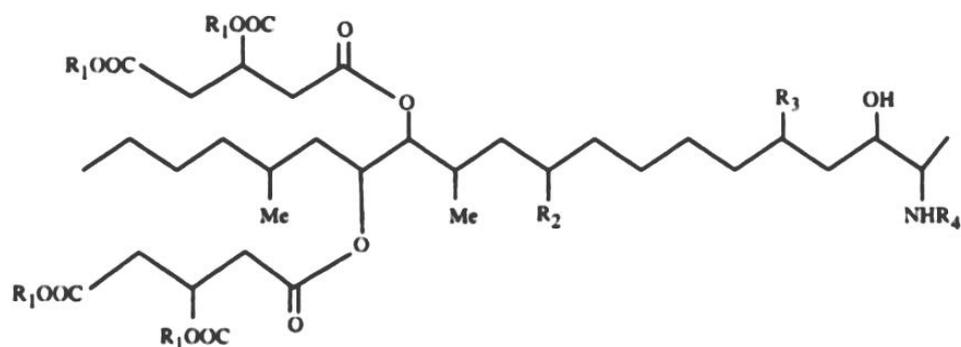
Fusarium-Arten können eine Vielzahl von toxischen Sekundärmetaboliten bilden, die sich in ihrer Struktur stark unterscheiden können. Die Einteilung erfolgt in drei Hauptgruppen, den Trichothecenen, den Zearalenonen und den Fumonisin.

1.3.1. Fumonisine

Fumonisine werden von *F. verticillioides* (Sacch.) Nirenberg (= *F. moniliforme* (Sheldon)), *F. proliferatum* (Nelson *et al.* 1993, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 2001) und einigen anderen *Fusarium*-Arten gebildet. Betroffen sind Nahrungsmittel aus Getreide und Mais aus den USA und China, Europa, Südafrika und Südamerika (Miller 1995).

Es gibt acht bekannte Fumonisine: FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁, FA₂, FC₁, FC₃, wobei nur die B- und C- Gruppen Naturprodukte sind und FB₁ am häufigsten vorkommt (Marasas 1996, Seo-Jeong *et al.* 1996).

Im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen sind sie wasserlöslich und resistent gegen alkalische Behandlung, die viele andere Toxine inaktiviert (Osweiler 2001). Es handelt sich chemisch um Diester zwischen Propan-1,2,3-Tricarboxylsäure und einem Pentahydroxycosan, das eine primäre Aminogruppe enthält (Musser 1996).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Fumonisin B ₁	H	OH	OH	H
Fumonisin B ₂	H	H	OH	H
Fumonisin B ₃	H	OH	H	H
Fumonisin A ₁	H	OH	OH	COCH ₃

Abbildung 1: Struktur einiger Fumonisine

aus Sweeney und Dobson 1998

Die Struktur der Fumonisine ähnelt sehr derjenigen von Sphingosinen, die das Rückgrat von Sphingolipiden bilden. Sphingolipide sind Bestandteile der Membranen von Gehirnzellen. Durch diese Strukturverwandtschaft und der damit vorhandenen Akzeptanz als Analogon für Sphingolipide erklärt sich ein Teil der toxischen Wirkung.

Von Fumonisin B₁ ist bekannt, dass es die Biosynthese der Sphingolipide inhibiert (Merril *et al.* 1993) und dies auch seine kanzerogenen Eigenschaften erklären könnte (Riley *et al.* 1996). Der Eingriff in den Sphingolipid-Stoffwechsel hat vermutlich auch einen Einfluss auf die hepatotoxische Wirkung und den Ausbruch der Equinen Leukoencephalomalazie (ELEM) bei

Pferden (Diaz und Boermans 1994). Diese Krankheit verursacht neurologische Defekte und äußert sich unter anderem durch abnormale Bewegungen, Blindheit, Lahmheit bis hin zu Koma und Tod (Miller 1995). Bei Schweinen werden bei hohen Belastungen Lungenödeme beobachtet (Colvin and Harrison 1992). Bei geringeren Belastungen können Leber- und Nierenschäden auftreten (Miller 1995). Toxische Wirkungen sind auch beim Menschen zu beobachten. In Indien klagten 1995 Personen eine Stunde nach dem Verzehr von Mais und Hirse über Abdominalschmerzen, Darmgeräusche und Durchfall. Fumonisin B wurde in den betroffenen Haushalten in deutlich höheren Konzentrationen gefunden als in Kontrollhaushalten (Bhat *et al.* 1997). Darüber hinaus wurde die These aufgestellt, dass Fumonisine, die in Ratten krebsfördernde Aktivität zeigen (Gelderblom *et al.* 1992), im Zusammenspiel mit Deoxynivalenol und Aflatoxinen Leberkrebs fördern (Ueno *et al.* 1997).

1.3.2. Zearalenon

Bei Zearalenon handelt es sich um ein nicht-steroidales Östrogen-Analog, das von *F. graminearum* und anderen *Fusarium*-Arten produziert wird. Betroffen sind vor allem Getreide, Mais, Früchte und Gemüse (Kuiper-Goodman *et al.* 1987, Jelinek *et al.* 1989, Patel *et al.* 1996, Park *et al.* 2002). Das Toxin konkurriert mit Östrogen um den Östrogen-Rezeptor. Diese östrogene Aktivität kann bei Aufnahme des Toxins zu Reproduktivitäts- und Fertilitätsproblemen und Hyper-Östrogenismus führen. Vor allem Schweine reagieren sehr sensitiv unter anderem mit Scham- und Gesäugeschwellungen, Scheiden- und Enddarmvorfällen, Dauerbrunst und Scheinträchtigkeit (Prelusky *et al.* 1994).

In einer Blutuntersuchung bei frühreifen Kindern zwischen 1978 und 1981 in Puerto Rico konnten erhöhte Zearalenon-Werte ermittelt werden (Saenz de Rodriguez 1984). Bei späteren statistischen Auswertungen konnten allerdings nur 50 % der Fälle mit einer Toxinaufnahme erklärt werden.

1.3.3. Trichothecene

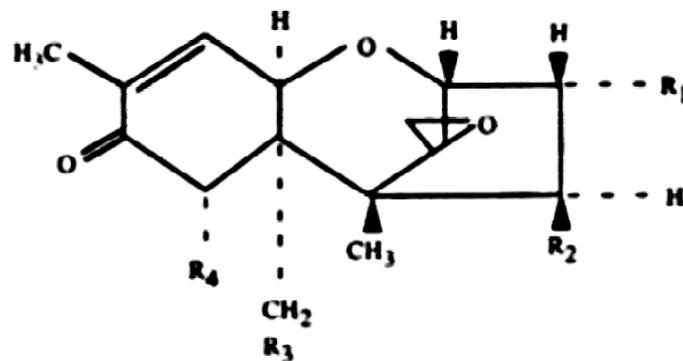
Trichothecene stellen eine Gruppe von Mykotoxinen dar, die von verschiedensten *Fusarium*-Arten aber auch von anderen Pilzgattungen gebildet werden. Bei den mindestens 24 *Fusarium*-Arten, die Trichothecene bilden (Marasas 1984), sind beispielhaft zu nennen: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* und *F. sporotrichoides*. In Tabelle 2 sind die Pilzgattungen aufgeführt, unter denen sich Trichothecenbildner befinden.

Tabelle 2: Trichothecen-produzierende Pilzgattungen

Gattung
<i>Cephalosporium</i>
<i>Cylindrocarpon</i>
<i>Fusarium</i>
<i>Myrothecium</i>
<i>Trichoderma</i>
<i>Trichothecium</i>
<i>Stachybotrys</i>
<i>Verticimonosporium</i>

aus Smith *et al.* 1994

Die Klassifizierung erfolgte nach der ersten entdeckten Substanz der Gruppe, dem Trichothecin (Freeman und Morrison 1949). Die Gruppe der Trichothecene ist sehr divers. Es handelt sich um trizyklische Sesquiterpene mit einem 12,13-epoxy-trichothec-9-en Ringsystem. Sie sind farblos, kristallin, optisch aktiv und löslich in Alkohol, Aceton, Ethylacetat und Chloroform, jedoch wenig löslich in Wasser (Ueno 1980).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	
Diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
T-2 Toxin	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Neosolaninol	OH	OAc	OAc	H	

Abbildung 2: Struktur einiger Trichothecene

aus Sweeney und Dobson 1998

Die Variabilität liegt in der Anzahl und Position der Hydroxylierungen und Komplexizität der Esterbindungen. Die Einteilung erfolgt in vier Untergruppen. Typ A besitzt am C-8-Atom keine Ketogruppe, Typ B besitzt eine Ketogruppe an C-8. Typ C hat eine zweite Epoxygruppe an C-7,8 oder C-9,10 und Typ D zeichnet sich durch einen makrozyklischen Ring mit zwei Esterbindungen zwischen C-4 und C-5 aus (Smith *et al.* 1994). Die Epoxide an Position C-12 und C-13 sind entscheidend für die Toxizität (Desjardins 1993). Von grundlegender Bedeutung sind die Typ A und Typ B Trichothecene. Zu den Typ A Trichothecenen gehören das T-2 und das HT-2-Toxin. Wichtige Vertreter der Typ B Trichothecene sind Deoxynivalenol und Nivalenol.

Trichothecene kommen vor allem in Getreide vor. Es gibt Hinweise darauf, dass sie beim Befall von Getreide als Virulenzfaktor eine Rolle spielen (Nicholson *et al.* 1998, Harris *et al.* 1999, Desjardins und Hohn 1997). Bei Aufnahme in entsprechend grosser Menge können sie akut toxisch und tödlich wirken. Von grösserer Bedeutung ist jedoch eine subakute Toxikose, die durch die Aufnahme von kleineren Dosen über längere Zeit zustande kommt (Prelusky *et al.* 1994). Dabei ist das auslösende Toxin oft schwer zu bestimmen, da die Vielfalt der Substanzen sehr gross ist und oft mehrere Toxine von einem Stamm gleichzeitig gebildet werden können. Von der Wirkung der Toxine können alle Tierarten und auch der Mensch betroffen sein. Das Ausmass der Schädigung bzw. Krankheit hängt jedoch von der Art des Toxins, der Stärke und der Dauer der Exposition und der jeweiligen Tierspezies ab. Hühner, Truthähne und Wiederkäuer besitzen eine hohe Toleranz, wohingegen Schweine und Menschen sehr empfindlich reagieren (Prelusky *et al.* 1994). Symptome sind zunächst Nahrungsverweigerung und Erbrechen. Trichothecene sind Immunsuppressoren und inhibieren die Protein-Synthese und die Tiere werden damit anfällig für andere Krankheiten. Der wahre Grund für eine Krankheit, die Toxikose, kann somit zunächst verborgen bleiben, was eine Behandlung erschwert (Ueno 1980, Pestka und Bondy 1990).

Auf zellulärer Ebene haben Trichothecene einen hemmenden Effekt auf die RNA- und DNA-Synthese und schädigen die Zellmembranen (European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins, Part 6, 2002). Darüber hinaus können Trichothecene eine Rolle bei der Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, spielen (Shifrin and Anderson 1999).

Beim ersten Fall, der auf Trichothecene aufmerksam machte, handelte es sich um T-2 Toxin, das in Getreide vorkam und zu einer lethalen Toxikose bei Milchvieh führte (Hsu *et al.* 1972). Deoxynivalenol wurde zunaechst in künstlich mit *Fusarium*-Arten infizierter Gerste gefunden

(Yoshizawa und Morooka 1973) und konnte daraufhin weltweit vor allem in Getreide identifiziert werden.

In Tierexperimenten zeigten Trichothecene eine 40fache stärkere Wirkung, wenn sie inhaliert wurden gegenüber der oralen Aufnahme (Smoragiewicz 1993). Aus diesem Grund ist auch die Gefährdung über Klimaanlage und Ventilationssysteme oder feuchte Wände bzw. Häuser für den Menschen von Bedeutung (Peraica *et al.* 1999).

Im folgenden werden die wichtigsten Vertreter der Typ A bzw. Typ B Trichothecene charakterisiert.

1.3.3.1. T-2 Toxin/HT-2 Toxin

Die Typ A-Toxine T-2 und HT-2 Toxin werden von *F. sporotrichoides*, *F. sambucinum*, *F. venenatum*, *F. acuminatum*, und *F. compactum* gebildet (Chelkowski 1989, Chu 1991, Bosch und Mirocha 1992, Miller und Trenholm 1994).

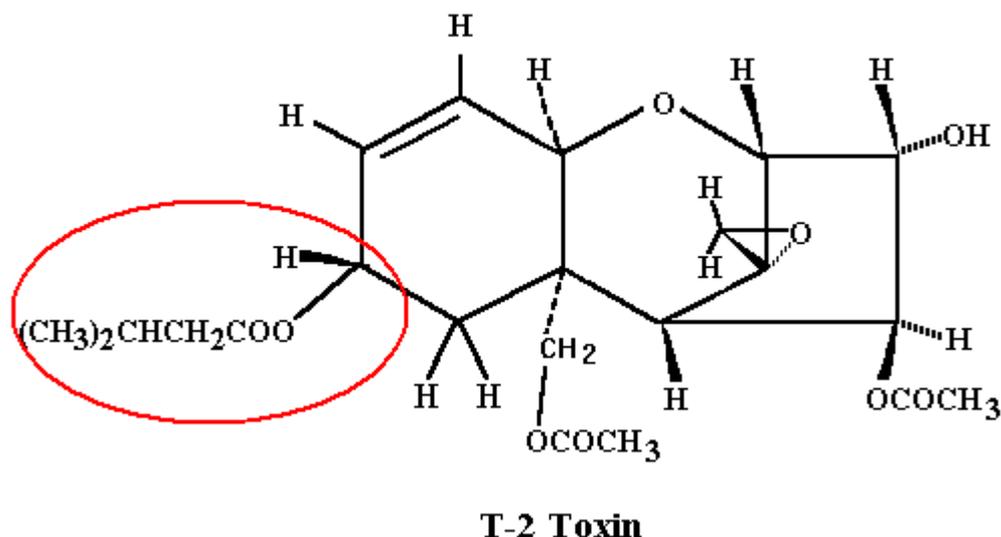


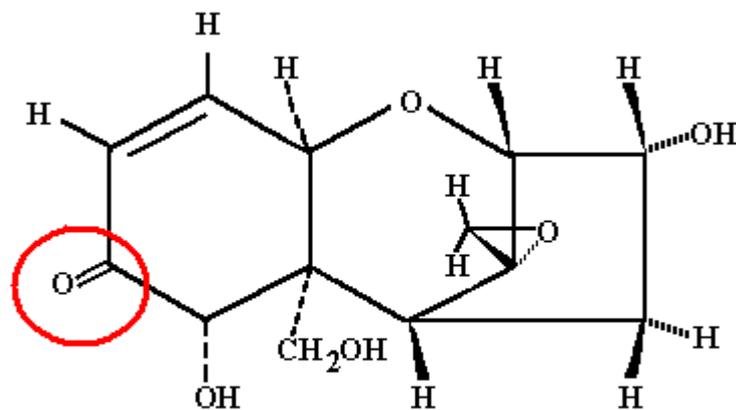
Abbildung 3: Struktur von T-2-Toxin. Markiert ist der Molekülrest, der von der allgemeinen Grundstruktur der Trichothecene abweicht.

Der wichtigste Produzent *F. sporotrichoides* kommt im Boden und auf Pflanzen in kühleren Regionen der Welt vor (Visconti *et al.* 1985). Berichte über das Vorkommen von T-2 Toxin und HT-2 Toxin liegen vor für Weizen, Mais, Hafer, Gerste, Reis, Bohnen und Soja und auch in einigen entsprechenden Produkten (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 2001). Die Bedingungen zur Toxin-Produktion auf Mais, Weizen und Reis hängen zum einen von der Art des Getreides ab, verallgemeinert lässt sich jedoch eine verstärkte Produktion bei

einer Temperatur von 20 °C und einem Feuchtegehalt von 35 % (a_w 0,990) feststellen (Mateo *et al.* 2002). T-2 Toxin ist ein sehr starker Inhibitor der Proteinsynthese und gilt als 10fach toxischer als Deoxynivalenol. Bei Betrachtung des LOEL (lowest-observed-effect-level) allerdings zeigen die beiden Toxine ähnliche Toxizität bei Aufnahme über die Nahrung (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 2001). In Verbindung mit der Aufnahme von *F. sporotrichoides* über die Nahrung konnten Ausbrüche der 'Alimentären Toxischen Aleukie' beobachtet werden (Ueno 1980, Yagen und Joffe 1976). Zwischen 1942 und 1947 erkrankten in einigen Regionen Russlands über 10 % der Bevölkerung an dieser Krankheit, die zur Schädigung des Knochenmarks führt und dadurch Blutarmut verursacht. Das Getreide war vor dem Winter nicht abgeerntet worden und im darauffolgenden Frühjahr stark mit *Fusarium*-Arten kontaminiert. In Japan konnte bei Pferden, die während des zweiten Weltkrieges mit getrockneten Bohnenhülsen gefüttert worden waren, schwere Erkrankungserscheinungen wie Störungen des Zentralen Nervensystems, des Herz-Kreislaufsystems und Leberstörungen beobachtet werden (Ueno 1980).

1.3.3.2. Deoxynivalenol (DON)

Deoxynivalenol ist ein Vertreter der Typ-B Trichothecene und wird von verschiedenen Vertretern der Gattung *Fusarium* produziert. Die wichtigsten hierbei sind *F. graminearum* (Miller *et al.* 1983) und *F. culmorum* (Greenhalgh *et al.* 1986, Muthomi *et al.* 1999, Hohn *et al.* 1995, Bakan *et al.* 2001).



Deoxynivalenol

Abbildung 4: Struktur von Deoxynivalenol. Markiert ist der Molekülrest, der von der allgemeinen Grundstruktur der Trichothecene abweicht.

DON ist ein sehr weit verbreitetes Mykotoxin in Nahrungs- und Futtermitteln, die auf Getreide basieren und kommt fast in allen Regionen vor, in denen Getreide angebaut wird. Betroffen sind überwiegend Weizen, Gerste und Mais, aber auch Hafer, Reis, Roggen und Hirse. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von 'Fusarium Head Blight' und der Kontamination von Weizen mit DON (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001). Die zwei auffälligsten akuten Wirkungen in Tieren sind verminderte Nahrungsaufnahme und Erbrechen. DON ist ebenfalls als Vomitoxin bekannt (von 'to vomit' (Englisch) – erbrechen). Bei längerer Exposition ist ein reduziertes Wachstum von Tieren zu beobachten. Bei hohen Konzentrationen können Schäden an Thymus, Milz, Herz und Leber auftreten. Das am häufigsten betroffene Tier ist das Schwein. Es treten unter anderem Verweigerung der Nahrungsaufnahme, vermindertes Wachstum, Lethargie, Hautirritationen und Durchfall auf (Prelusky *et al.* 1994). Geflügel und Rinder sind weniger empfindlich. Bei Geflügel kann die Eiqualität beeinträchtigt und die Größe der Tiere vermindert sein. Bei Rindern können verringerte Nahrungsaufnahme, verringerte Milchmenge, Haarausfall, verzögerte Blutgerinnung und blutiger Durchfall auftreten (Prelusky *et al.* 1994).

Auch für den Menschen ergeben sich Gesundheitsrisiken. In Asien wurden einige Ausbrüche akuter Toxikose beobachtet, deren Symptome Brechreiz, Erbrechen, Störungen des Gastro-Intestinaltraktes, Schwindel, Durchfall und Kopfschmerzen waren. Auslöser war die Aufnahme von Deoxynivalenol über Getreideprodukte. Bei Ersatz des kontaminierten Getreides mit nicht kontaminierten Nahrungsmitteln verschwanden die Symptome (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 2001). Beispiel hierfür ist die 'Red Mold Disease', die in Japan schon 1914 beobachtet wurde (Yoshizawa 1983). Der Name stammt von der rötlichen Färbung der Körner. Symptome traten nach wenigen Minuten bis zu Stunden nach der Nahrungsaufnahme auf und betrafen sowohl Menschen als auch Tiere (Beardall and Miller 1994). Ähnliche Krankheitssymptome wurden auch in China nach dem Genuss von verschimmeltem Mais oder Weizen beobachtet. Erhöhte Konzentrationen von DON konnten auch hier festgestellt werden (Beardall and Miller 1994). In Indien traten im Jahr 1987 nach dem Genuss von Brot Lebensmittelvergiftungen auf (Bhat *et al.* 1989 a,b). Symptome waren Bauchschmerzen, Halsreizung und Durchfall. Die Reaktionen der Betroffenen waren dosisabhängig. Von dem entsprechenden Weizen konnte verschiedene *Fusarium*- und *Aspergillus*-Arten isoliert werden. Darüber hinaus konnten DON, Acetyldeoxynivalenol und T-2-Toxin detektiert werden (Bhat *et al.* 1989 b). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Diskussionen über mögliche Grenzwerte von Mykotoxinen in Lebensmitteln eröffnet. Bhat *et al.* (1989) machten aufgrund der Ereignisse in Indien den Vorschlag eines Grenzwertes von 34 ppb für DON in Weizen- und Weizenprodukte. Zahlreiche Diskussionen über mögliche Grenzwerte werden inzwischen geführt. Die Europäische Kommission legte 1999 anhand eines Vergleiches verschiedener Toxizitätsstudien einen t-TDI-Wert (temporary total daily intake) von 1 µg/kg bw/day fest (European Commission, Scientific Committee on food, Opinion of *Fusarium* toxins Part 1, 1999). Der Wert blieb vorläufig (temporary), da es Ziel war, einen gruppenumfassenden Grenzwert für die wichtigsten Trichothecene zu erstellen.

Die Wahrscheinlichkeit ist sehr hoch, dass verschiedene Mykotoxine gleichzeitig gebildet werden bzw. auftreten. Untersuchungen wurden durchgeführt über die Toxizität bei Kombination von Mykotoxinen (European Commission, Scientific Committee on food, Opinion of *Fusarium* toxins Part 6, 2002). Für T-2 Toxin, DON und Nivalenol konnte *in vitro* eine dosisabhängige Addition, z.T. aber auch ein Antagonismus beobachtet werden. *In vivo* jedoch wurde für T-2 Toxin und DON eine antagonistische Wirkung gesehen. Für eine endgültige Aussage darüber, ob eine Addition der Wirkungen auftritt oder nicht, sind bis jetzt zu wenige Daten vorhanden. Aus diesem Grunde wurde von dem ursprünglichen Ziel einen

gruppenumfassenden TDI-Wert (total daily intake) zu erstellen, abgerückt. Folgende TDI-Werte wurden für die einzelnen Toxine festgelegt. Für Nivalenol, T-2 Toxin und HT-2 Toxin ist die Datenlage noch nicht ausreichend und es wurden vorübergehende Werte festgelegt (t = temporary).

Tabelle 3: TDI-Werte für einige Trichothecene

DON	TDI = 1	µg/kg bw/day
Nivalenol	t-TDI = 0,7	µg/kg bw/day
T-2/HT-2 Toxin	t-TDI = 0,06	µg/kg bw/day

aus European Commission, Scientific Committee on Food, Opinion on *Fusarium* toxins Part 6, 2002

Die IARC (International Agency for Research on Cancer) ordnete DON in die Kategorie 3 ein. Dies bedeutet, dass eine Karzinogenität für Menschen nicht eindeutig nachweisbar ist.

Darüber hinaus zeigt DON keine mutagene Wirkung im Ames Test. Teratogene Effekte sind weder in Mäusen, Ratten und Kaninchen, noch in Schweinen zu erkennen.

DON ist wie die meisten Mykotoxine sehr stabil und wird bei einem pH von 10 erst nach 60 Minuten bei 100 °C partiell abgebaut und nach 30 Minuten bei 120 °C vollständig zerstört (Wolf und Bullerman 1998). Mykotoxine können auch durch das Substrat stabilisiert werden. Lauren und Smith (2001) zeigten, dass DON und NIV erst nach Behandlung mit einer Bikarbonat-Lösung und Erhitzung auf 80 °C oder 110 °C für 2 bis 12 Tage zwischen 60 % und 100 % reduziert werden. Es besteht somit die Gefahr, dass DON bei der Herstellung von Nahrungsmitteln erhalten bleibt und man das Toxin im Endprodukt findet. Sämtliche Produkte, die Getreide als Ausgangssubstanz haben, sind betroffen. Beispiele hierfür sind Mehl (Schollenberger *et al.* 2002), Brot, Nudeln, Frühstückscerealien, Kindernahrung (Schollenberger *et al.* 1999, Martins und Martins 2001) Malz (Schwarz 2001) und Bier (Niessen *et al.* 1991, Odhav and Naicker 2002, Molto *et al.* 2000, Vanne und Haikara 2001).

Hydroxylierung benötigt wird (Alexander *et al.* 1998). Bei Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, akkumulieren die Moleküle, die zuvor im Biosyntheseweg auftauchen bis hin zum Isotrichodermin (McCormick und Hohn 1997). Das Acetyltransferase-Gen Tri3 wurde aus *F. sporotrichoides* kloniert, und das entsprechende Enzym ermöglicht die Umwandlung von 15-Decalacetin zu Caloneurin (McCormick *et al.* 1996). Dieser Schritt führt zur weiteren Biosynthese von T-2 Toxin. Die Synthese von Deoxynivalenol zweigt hier ab. Die Trichothecene können neben der Einteilung in A- und B-Gruppen auch auf eine andere Weise eingeteilt werden. Hierbei wird zwischen zweifach oxygenierten Trichdiolen, den d-Typen und dreifach oxygenierten, den t-Typen unterschieden (Kimura *et al.* 1998). Der t-Typ erfasst sowohl die A-, als auch die B-Gruppe. Entscheidend für die Vertreter des t-Types ist die Einführung einer O-Acetyl-Gruppe an C-3, die zur Resistenz der Organismen gegenüber den Toxinen und damit zu einem Selbstschutz führt (Kimura *et al.* 1998). Das entsprechende Gen wird als Tri101 bezeichnet. Ein weiteres Gen, Tri12, kodiert für eine Trichothecen Efflux-Pumpe bei *F. sporotrichoides* (Alexander *et al.* 1999). Bei *F. graminearum* wurde ein identisches Gen entdeckt, Tri102, das den Transport von Trichothecenen aus den Zellen ermöglicht (Wuchiyama *et al.* 2000). Bei dieser Art konnte auch ein Transkriptionsaktivator der Trichothecen-Biosynthese identifiziert werden. Das Protein Tri6 besitzt Zink-Finger-Domänen und bindet an verschiedene Promotoreregionen, unter anderem an drei Stellen des Tri5-Promotors (Hohn *et al.* 1999, Matsumoto *et al.* 1999). Ein weiteres regulatorisches Gen ist Tri10, das die Expression von Tri4, Tri5, Tri6 und Tri101 beeinflusst (Tag *et al.* 2001). Es besteht eine regulatorische Schleife zwischen Tri6 und Tri10, wobei Tri10 die Expression von Tri6 positiv beeinflusst und Tri6 die Transkription von Tri10 herunterreguliert.

Neueste Untersuchungen klärten die Rolle des Tri8-Gens auf. Das Gen kodiert für eine Trichothecen C-3 Esterase, die die C-3-Gruppe deacetyliert. Da eine freie C-3-Gruppe ein entscheidender Faktor für die Toxizität darstellt, wird die Esterase als ein wichtiger Toxizitätsfaktor gesehen. Bei Zerstörung des Tri8-Gens akkumulieren C-3-acetylierte Verbindungen wie z.B. 3,15-Diacetyldeoxynivalenol und Caloneurin bei *F. graminearum* – Stämmen und 3-Acetyl-T-2-Toxin bei *F. sporotrichoides* (McCormick und Alexander 2002). *F. graminearum* kann in zwei Chemotypen eingeteilt werden, die entweder Deoxynivalenol oder Nivalenol (NIV) bilden können (Ichinoe *et al.* 1983). Um den Unterschied des jeweiligen Biosynthesewegs zu untersuchen, wurden von Lee *et al.* (2002) verschiedene Stämme molekularbiologisch untersucht. Zwei Gene, Tri13 und Tri7 spielen eine grosse Rolle. Ist das Tri13-Gen deletiert, so wird DON anstatt NIV gebildet. Mit Tri7 sind ähnliche Beobachtungen zu machen. Tri13 und Tri7 werden benötigt für die Oxygenierung und

Acetylierung am C-4-Atom bei der Synthese von NIV. Tri13 stellt den Schalter dar, der zwischen DON – und NIV-Bildung unterscheidet, Tri7 ist verantwortlich für weitere Modifikation im Biosyntheseweg von NIV.

Die Gene Tri3, Tri4, Tri5, Tri6, Tri7, Tri8, Tri11, Tri12 und Tri13 liegen als Cluster im Genom vor (Hohn *et al.* 1993, Keller und Hohn 1997, Brown *et al.* 2001). Weitere Gene in dem Cluster sind Tri9, Tri10, die jedoch für noch nicht identifizierte hypothetische Proteine kodieren (Lee *et al.* 2001). Tri101 liegt nicht in diesem Cluster und muss eine unabhängige Herkunft haben, die noch nicht geklärt ist (Kimura *et al.* 1998).

1.5.Gushing

Neben des Risikos einer Bildung von Mykotoxinen, werden *Fusarium*-Arten auch im Zusammenhang mit Gushing bei Bier genannt (Amaha *et al.* 1973, Gjertsen *et al.* 1965, Niessen *et al.* 1991).

Unter Gushing versteht man das spontane Überschäumen von Bier, was auch als „Wildwerden des Bieres“ bezeichnet wird. Beim Öffnen einer Flasche Bier entweicht dabei plötzlich Kohlendioxid. Dies wird begleitet von starker Schaumbildung und es kommt zu einer unterschiedlich starken Entleerung der Flasche. Dieses Phänomen tritt unregelmässig auf. Zu Gushingpromotoren zählen Kalziumoxalatkristalle, Metallionen, Flaschenreinigungsmittel und Schimmelpilzbefall des Malzes (Amaha *et al.* 1973, Gjertsen *et al.* 1965, Niessen *et al.* 1991). Gushing kann anhand der Entstehungsgründe in zwei Gruppen eingeteilt werden (Gjertsen 1967). Primäres Gushing wird im Zusammenhang mit verminderter Qualität des Rohstoffes Malz genannt. Bei dem sekundären Gushing handelt es sich um technologische Fehler während des Brauprozesses oder des Verpackungsvorganges. Schimmelpilzbefall von Malz ist wahrscheinlich der auslösende Faktor für primäres Gushing (Amaha 1973, Kitabatake 1978, Beck *et al.* 1991, Hernandez *et al.* 2000). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass kleine hydrophobe Proteine, sogenannte Hydrophobine, die von Pilzen gebildet werden, Auslöser von Gushing sein könnten (Kleemola *et al.* 2001, Hippeli und Elstner 2002). Die Untersuchung der Gushingneigung der Rohprodukte bzw. von Rohfrucht, Malz und Würze kann anhand eines Tests bestimmt werden (Donhauser *et al.* 1990). Das Testsystem beruht auf einer Messung des Überschäumvolumens eines karbonisierten Malzauszuges. Mit Variationen der Methode können auch Rohfrucht, Würze und Lagerbiere untersucht werden. Die Proben werden dann je nach ihrer Gushingneigung in stabil, labil und instabil eingeteilt.

1.6. Detektion von *Fusarium*-Arten mit molekularbiologischen Methoden

Die mikrobiologische Detektion von *Fusarium*-Arten ist nicht immer ausreichend genau bzw. praktikabel für die jeweils zu treffenden Aussagen. Neben dem Nachteil des Zeitaufwandes durch die Kultivierung, kann das Nährmedium das Ergebnis dadurch beeinflussen, dass bestimmte Stämme bevorzugt wachsen können. Die Identifizierung erfolgt danach über eine optische Beurteilung, die sich auf morphologische Merkmale z.B. der Kolonie und der Konidien stützt. Diese Methode kann verlässlich nur von erfahrenen Personen durchgeführt werden. Aufgrund dieser Nachteile wurde nach alternativen Detektionsmöglichkeiten gesucht. Als geeignet hierfür erwiesen sich immunologische und DNA-gestützte Methoden (Nicholson 2001). Die molekulardiagnostische Analyse von Mikroorganismen in klinischen Proben (Tang *et al.* 1997, Karch *et al.* 1995) und in Lebensmitteln (Candrian 1995) wird schon seit einiger Zeit angewandt.

Eine Möglichkeit stellen Hybridisierungen mit sequenzspezifischen DNA-Sonden dar, die jedoch für die Detektion von pilzlicher DNA aus Pflanzenmaterial zu wenig sensitiv sind (Nicholson 2001). Bessere Ergebnisse erzielen bei dieser Zielsetzung PCR-Verfahren. Durch die Auswahl geeigneter Primer-Paare wurden verschiedenste PCR-Protokolle entwickelt, z.B. zur Detektion von *F. culmorum* (Schilling *et al.* 1996), *F. poae* (Parry und Nicholson 1996) und *F. graminearum* (Niessen und Vogel 1997). Darüber hinaus wurde ein Protokoll entwickelt zur Detektion der Gruppe der trichothecenbildenden *Fusarium*-Arten (Niessen und Vogel 1998). Dieser Nachweis beruht auf der Gensequenz der Trichodien-Synthase, des ersten Enzyms im Biosyntheseweg von Trichothecenen.

Für die Detektion von *Fusarium*-Arten in klinischen Proben ist die PCR eine geeignete Methode (Hue *et al.* 1999, Jaeger *et al.* 2000). Die Limitation einer herkömmlichen PCR liegt in der fehlenden Möglichkeit der Quantifizierung der vorhandenen Menge an DNA. Aus diesem Grund werden verstärkt quantitative PCR-Verfahren entwickelt. Eine Möglichkeit ist die kompetitive PCR. Bei Untersuchungen zur Resistenz der Wirtspflanzen und der Rolle von Mykotoxinen bei der Virulenz wurde diese Methode zur Bestimmung von *F. culmorum* und *F. graminearum* eingesetzt (Nicholson 2001, Nicholson *et al.* 1998). Die Effizienz von Fungiziden wurde durch die quantitative Analyse von einigen Trichothecenbildenden *Fusarium*-Stämmen untersucht (Edwards *et al.* 2001). Eine Echtzeit-Amplifikation und Quantifizierung zur Bestimmung von Trichothecen-produzierenden *Fusarium*-Arten wurde mit Hilfe der LightCyclerTM Technologie (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) entwickelt (Schnerr *et al.* 2001).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, eine gesicherte Beurteilung der von Getreide ausgehenden Gefährdung durch dessen Befall mit *Fusarium*-Arten zu ermöglichen. Dabei sollten verschiedene Strategien verfolgt und mehrere schnelle, einfache und sichere Methoden zur Detektion von *Fusarium*-Arten auf Getreide entwickelt werden. Diese möglichst einfach anzuwendenden Methoden sollten im Routinescreening von Getreide in den entsprechenden Industriebetrieben einsetzbar sein. Prädestiniert für eine solche Zielsetzung sind Methoden, die sich auf Sequenzunterschiede der DNA bei verschiedenen Arten stützen. Die Methoden sollten als Alternative zu herkömmlichen langwierigen und/oder ungenauen Methoden eingesetzt werden können. Die Entwicklung DNA-gestützter Detektionsmethoden für *Fusarium*-Arten sollte dazu beitragen, den Befallsstatus und die Befallsgeschichte des Getreides untersuchen zu können.

Die Methoden sollten jeweils auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft und an Getreideproben unterschiedlichster Art getestet werden. Die bei diesen Getreideproben erhaltenen Ergebnisse sollten mit anderen vorhandenen Parametern verglichen werden, wie z.B. Ergebnis des Gushingtestes bzw. Mykotoxingehalt.

Da die Untersuchung der Biosynthese der Mykotoxine und die darauf wirkenden Einflussfaktoren ein sehr umfangreiches Themengebiet darstellt, ist es momentan sinnvoll, zunächst das Risiko aufgrund der Befallsstärke mit *Fusarium*-Arten abzuschätzen. Um jedoch in Zukunft bessere Aussagen über die Mykotoxinbildung machen zu können, war ein weiteres Ziel der Arbeit, auf molekularer Ebene Untersuchungen zur Trichothecenbildung durchzuführen. Dabei sollte die Expression des Tri5-Gens im Vergleich mit der Toxinbildung gemessen werden. Eine entsprechende Methode sollte etabliert werden und diese bei Versuchen mit verschiedenen *Fusarium*-Arten und verschiedenen Kultivierungsbedingungen angewendet werden. Neben der Beobachtung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Mykotoxinbildung, sollte ein Vergleich zwischen Genexpression und der tatsächlichen Bildung der Toxine gezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

2.1.1.1. HPLC

Tabelle 4: Geräte zur HPLC-Analytik

Art	Bezeichnung	Hersteller
Probengeber	GINA 50	Gynkotec, München
Entgasung	Degasser	Gynkotec, München
Pumpe	High Precision Pump Model 480	Gynkotec, München
Trennsäule	LUNA 5u, C18(2), 250×4,6 mm	phenomenex, Aschaffenburg
Säulenofen	Kühlofen Modell K-5	Techlab GmbH, Erkerode
Detektion	UV-Detektor UVD 320S	Gynkotec, München
	Spectrofluorometric Detector RF-551	Shimadzu GmbH, Duisburg
Auswertungssoftware	Chromleon Client Version 4.12A Build	

2.1.1.2. Sonstige Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät		Hersteller
Analysenwaage	BP 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	2540 ELV	Systemec GmbH, Wettenberg
Brutschrank	UE 500	Memmert GmbH & Co., Schwabach
Elektrophorese-Kammer	12*14 cm	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Getreidestecher	Probesteher nach Barth	Glasbläserei d. VLSF, Berlin
Laborscheibenmühle	DLFU	Bühler GmbH, Braunschweig
LightCycler™		Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Membran-Vakuumpumpe	ME4	Vakuubrand GmbH & Co.,

		Wertheim
pH-Meter	Mikroprozessor 761 calimatic	Knick GmbH & Co., Berlin
Rapidcycler		Idaho Technology Inc., Salt Lake City, USA
Reinstwassersystem	RS 90-4/UF	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Rotationsverdampfer	Vacuumcontroller, Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
	VV 2000, WB 2000	HEIDOLPH Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau
Spannungsquelle für Elektrophorese	PPS 200-10	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Thermocycler	OmniGene Mastercycler [®] Gradient	Thermo Hybaid, Ulm Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	1 K 15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Tischzentrifuge	Sigma 112	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Ultraschallprozessor	UP 200s	dr. hielscher GmbH, Teltow (Berlin)
UV-Transilluminator	UVT 28 M	Herolab GmbH, Wiesloch
Vibrationschüttler	MS2 Minishaker	IKA [®] -Werke GmbH & co. KG, Staufen
Video Imaging System	E.A.S.Y. Store, 429 K	Herolab GmbH, Wiesloch
Waagen	SBA 52; SAC 63	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Wasserbad/Umwälzthermostat	MA 6 B	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Z E2 K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen

2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

2.1.2.1. Chemikalien

Aluminium Chlorid, Merck KGaA, Darmstadt

Ethylacetat, J.T.Baker

Chloroform, Merck KGaA, Darmstadt

Folgende Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, bezogen:

Acetonitril Chromasolv[®], gradient grade für HPLC,

Methanol

Deoxynivalenol (DON)

3-Acetyl- Deoxynivalenol (3-AcDON)

15-O-Acetyl-4-Deoxynivalenol (15-O-AcDON)

Polyvinylpyrrolidon (PVP-40T)

Wasser für die Molekularbiologie

2.1.2.2. Stammlösungen

Lyse-Puffer für DNA-Extraktion

EDTA	20 mM
Tris	10 mM
Guanidin-HCl	500 mM
NaCl	250 mM
Triton X-100	1 %
PVP	6 %

PCR-Reaktionspuffer (10fach)

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansatz

	<i>GaoA</i>	<i>Tox5 /Opt18</i>
Tris-HCl	100 mM	100 mM
KCl	500 mM	500 mM
MgCl * 6 H ₂ O	10 mM	20 mM
Glycerin	2,5 % (v/v)	5 %
DMSO	4 % (v/v)	
(NH ₄) ₂ SO ₄		50 mM
pH	9,2	9,2

PCR-Reaktionspuffer für Rapidcycler (10fach)

Tabelle 7: Rapidcycler-PCR-Reaktionsansatz

	<i>Gao A</i>	<i>Tox 5</i>
TrisHCl pH 8,3	500 mM	500 mM
BSA	2,5 mg/ml	2,5 mg/ml
Saccharose	20 %	20 %
MgCl ₂	30 mM	50 mM

Enzymdiluent für Rapidcycler-PCR

Tris (pH 8,3) 10 mM
 BSA 2,5 mg/ml

Stop-Puffer für Agarosegele

Bromphenolblau 0,25 %
 Saccharose 40 % (w/v)

100 bp-Leiter

für Endkonzentration von 0,5µg/10µl zu Stammlösung (Amersham Biosciences, Freiburg)

zugeben:

Stop-Puffer	200 µl
H ₂ O	1700 µl

TBE-Puffer (10fach)

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,2 mM
pH	8

4*SSC-Hybridisierungspuffer

NaCl	0,6 M
Na-Citrat-Dihydrat	0,06 M
pH	7

K_iPO₄ – Puffer

KH ₂ PO ₄ (0,5 M)	13 ml
K ₂ HPO ₄ (0,5 M)	87 ml
pH	7,4

2.1.2.3. Verwendete Kulturmedien

GYEP-Variationen (nach Ueno)

D(+)-Glucose	10 g bzw. 2,5 g
Pepton aus Casein	1 g
Hefeextrakt	1 g
H ₂ Odest	1 l
pH	6,6

Malzextrakt-Medium

Malzextrakt	20 g
Pepton aus Sojabohnenmehl	2 g
H ₂ Odest	ad 1 l
Agar	15 g
pH	5,6

Reismehlmedium (modifiziert nach Misra)

Reismehl (Naturreis)	40 g
D(+)-Glucose	30 g
Hefeextrakt	1 g
H ₂ Odest	1 l

Herstellung:

Reismehl in 500 ml H₂Odest 15 Minuten kochen.

Den entstandenen Brei 15 Minuten bei 8000 U/Min zentrifugieren.

Zentrifugat sammeln, Rückstand aufschlämmen und erneut zentrifugieren.

Zentrifugate vereinigen, die restlichen Komponenten zugeben und auf 1 l Gesamtvolumen auffüllen.

2.1.3. Untersuchungsmaterial

Tabelle 8: Verwendete Getreideproben

<i>Probenart</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Beschreibung</i>		
Kontrollweizen	1	Keine Kontamination mit <i>Fusarium</i>		
Versuchsweizen	100	Mit <i>Fusarium</i> -Arten kontaminiert	Befallsdaten (Menge und Art) vorhanden	
Weizen	141	Natürlich kontaminiert	DON/ZEA-Daten	DON 0 – 32,4 mg/kg
Versuchsweizen	21	Künstlich kontaminiert	Befallsdaten (Menge) vorhanden	DON 0,3-11,8 mg/kg; bis 82 % Befall
Mais	9	Natürlich kontaminiert	DON/ZEA	
Malz	41	Industrieproben	DON	
Getreide	27	Aus Mühle		
Getreide	135	Industrieprobe		
Malze	112	Gushingproben	60 Gerstenmalz 52 Weizenmalz	Überschäumvolumen von 0 ml – 233 ml

2.1.4. Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz</i>
GaoA-V2 (Niessen 1997)	5'-AGG GAC AAT AAG TGC AGA C-3'
GaoA-R2 (Niessen 1997)	5'-ACT GTG CAC TGT CGC AAG TG-3'
GaoA-V2-Dig	5'-DIG-AGG GAC AAT AAG TGC AGA C-3'
GaoA-R2-Dig	5'-DIG-ACT GTG CAC TGT CGC AAG TG-3'
GaoA Sonde Bio (Niessen 1998)	Bio-5'-GGC CAA ATA ATC ACC GAC AAC CTA-3'-Bio
Tox5-1 (Niessen 1998)	5'-GCT GCT CAT CAC TTT GCT CAG-3'
Tox5-2 (Niessen 1998)	5'-CTG ATC TGG TCA CGC TCA TC-3'
Opt18 F (Schilling 1996)	5'-GAT GCC AGA CCA AGA CGA AG-3'
Opt18 R (Schilling 1996)	5'-GAT GCC AGA CGC ACT AAG AT-3'
SDA-S1 v	5'-GCA TTA TAG TAC CTG TCT CTC GAG AAA CAA TYG TTG GCA T-3'
SDA-S2 r	5'-TTG AAT AGT CGG TTA CTT CTC GAG TGC TRT CAT CCA AAA-3'
SDA-B2 r	5'-CCT GCT CTC (GT)TC C-3'
Bt2 a (Glass 1995, Doohan 1999)	5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3'
Bt2 b (Glass 1995, Doohan 1999)	5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'
HaTri F (Edwards 2001)	5'- CAG ATG GAG AAC TGG ATG GT-3'
HaTri R (Edwards 2001)	5'- GCA CAA GTG CCA CGT GAC-3'

2.1.5. Mikroorganismen

Folgende *Fusarium*-Stämme wurden in der Arbeit verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Bezeichnung
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0748
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0747
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0754
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0193
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0302
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0177
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0169
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0185
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0131
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0122
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4529
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4527

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Gewebekulturen, Braunschweig

TMW: Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie der TU München, Freising-Weihenstephan

2.1.6. Verwendete DNA-Isolate

Zum Testen der Spezifität von PCR-Protokollen wurde gereinigte DNA aus Kulturen folgender Organismen eingesetzt.

Tabelle 11: DNA-Isolate

Stamm	Bezeichnung
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4527
<i>Fusarium culmorum</i>	DSM 62191
<i>Fusarium cerealis</i>	CBS 589.93
<i>Fusarium crookwellense</i>	CBS 623.85
<i>Fusarium heterosporum</i>	DSM 62331
<i>Fusarium lunulosporum</i>	CBS 636.76
<i>Fusarium reticulatum</i>	DSM 62395
<i>Fusarium robustum</i>	CBS 637.76
<i>Fusarium sambucinum</i> v.s.	DSM 62186
<i>Fusarium sulphureum</i>	DSM 64233
<i>Fusarium trichothecoides</i>	CBS 136.73
<i>Fusarium tumidum</i>	CBS 486.76
<i>Fusarium venenatum</i>	CBS 458.93
<i>Fusarium poae</i>	DSM 63276
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	CBS 412.86
<i>Fusarium camptoceras</i>	CBS 193.65
<i>Fusarium equiseti</i>	CBS 466.92
<i>Fusarium scirpi</i>	CBS 448.84
<i>Fusarium dlamini</i>	CBS 672.94
<i>Beltraniella portocicensis</i>	
<i>Hypomyces rosellus</i>	CBS 521.81
<i>Drechslera teres</i>	CBS 378.59
<i>Gliocephalotrichum</i> n.spec.	NRRL 2993
<i>Mucor mucedo</i>	DSM 809
<i>Stachybotrys chartarum</i>	CBS 329.37
<i>Microdochium nivale</i> var.nivale	A 6
<i>Trichoderma virens</i>	CBS 344.47
<i>Penicillium expansum</i>	DSM 62841
<i>Triticum monococcum</i>	
<i>Triticum</i>	

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Gewebekulturen, Braunschweig

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktionsverfahren für Pilz-DNA aus Getreide- und Malzproben

2.2.1.1. Optimierung des Verfahrens

Die Getreideproben wurden mit einer Laborscheibenmühle DLFU (offiziell von EBC und MEBAK anerkannte Mühle) gemahlen. In wenigen Fällen wurden sie ungemahlen eingesetzt. Malzproben wurden immer gemahlen. Das Probenvolumen für die Extraktion betrug in der Regel 20 g. Bei abweichendem Probenvolumen wurden die Reaktionsvolumina entsprechend angepasst.

Zur Lyse der DNA wurden 25 ml Lysepufferstammlösung mit 55 ml ddH₂O verdünnt und mit dem Probenmaterial vermischt. Danach erfolgte eine einminütige Ultraschallbehandlung mit maximaler Amplitude mit einer UP 200s Ultraschallsonde. Nach dem Sedimentieren der Proben wurden 800 µl vom Überstand abgenommen und mit 400 µl eiskaltem Ethanol vermischt. Die Lösung wurde in zwei Schritten auf die Extraktionssäulen des 'High Pure Template Preparation Kit' (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) zentrifugiert. Die Extraktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in zwei Schritten mit je 100 µl des auf 72 °C erwärmten Elutionspuffers. Für Zeiträume von wenigen Wochen wurde die DNA bei 4° C gelagert, darüber hinaus bei -20 °C.

2.2.1.2. Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu testen, wurde aus zwei verschiedenen Weizenproben, die natürlicherweise mit *Fusarium*-Arten kontaminiert waren, sechsmal unabhängig voneinander DNA extrahiert. Die DNA wurde im LightCyclerTM amplifiziert und quantifiziert. Aus den DNA-Mengen wurde die Standardabweichung zwischen den Einzelnextraktionen der jeweiligen Weizenprobe berechnet.

2.2.2. Versuche zur Probenahme

Als Modell wurde ein Getreidesack (50 kg) verwendet. Bei dem Getreide handelte es sich um Gerste, die mit *F.culmorum*-Stämmen feldinfiziert wurde. Sie wurde von der Bundesanstalt für Saatgutforschung in Grünbach zur Verfügung gestellt. Es wurden mehrfach mit einem

Probenstecher fünf Proben mit je 200 g an verschiedenen Stellen gezogen. Für die DNA-Extraktion wurden 20 g weiterverwendet. Als zusätzliche Probe wurde ein Gemisch der Einzelproben hergestellt. Die DNA wurde im LightCycler™ amplifiziert und quantifiziert.

2.2.3. PCR-Protokolle

2.2.3.1. Einzel-PCR- Protokolle

Es wurden PCR-Programme verwendet, die die Bestimmung von *F. graminearum* (GaoA), *F. culmorum* (Opt 18) und der Gruppe der Trichothecenbildner (Tox5) ermöglichten.

Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz für 25 µl-Volumen

	Konzentration	Volumen
10fach Reaktionspuffer	1 x	2,5 µl
dNTP	10 mM	0,25 µl
Primer (50 mM)	5 mM	0,25 µl
rTaq-Polymerase (5000 U/ml, amersham Biosciences, Freiburg)	1,25 U	0,25 µl
Wasser für die Molekularbiologie		20,5 µl
DNA-template		1 µl

Die PCR-Reaktionen wurden in PCR-Reaktionsgefäßen (0,2 ml) in einem Eppendorf Mastercycler® Gradient Thermocycler mit folgenden Temperaturprogrammen durchgeführt.

4 Minuten	94 ° C	
20 Sekunden	94 ° C	} 40 Zyklen
20 Sekunden	56 ° C (Gao A)	
	63 ° C (Opt 18)	
	65 ° C (Tox 5)	
30 Sekunden	72 ° C	
5 Minuten	72 ° C	

2.2.3.2. Triplex-PCR

Zur gleichzeitigen Detektion von *F. graminearum* (GaoA), *F. culmorum* (Opt 18) und der Gruppe der Trichothecenbildner (Tox5) wurde durch Kombination der Primer-Paare eine Triplex-PCR entwickelt.

Tabelle 13: PCR-Reaktionsansatz für Triplex-PCR

	Volumen
10fach Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,25 µl
Primer GaoA V2/R2 (50 mM)	0,34 µl
Primer Opt 18 V/R (50 mM)	0,093 µl
Primer Tox5-1/5-2 (50 mM)	0,12 µl
rTaq-Polymerase (5000 U/ml)	0,25 µl
Wasser für die Molekularbiologie	19,7 µl
DNA-template	1 µl

Die PCR-Reaktion wurde in PCR-Reaktionsgefäßen (0,2 ml) in einem OmniGene Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

4 Minuten 94 ° C

1 Minute	94 ° C	} 5 Zyklen
2 Minuten	64,5 ° C	
3 Minuten	72 ° C	

1 Minute	94 ° C	} 30 Zyklen
30 Sekunden	64,5 ° C	
1 Minute	72 ° C	

5 Minuten 72 ° C

2.2.3.3. Rapidcycler-PCR

Für den Einsatz im Rapidcycler wurden Protokolle eingesetzt für die Detektion von *F. graminearum* und die Gruppe der Trichothecenbildender.

Die Reaktionsansätze wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt und dann in Glaskapillaren (10 µl für Rapidcycler, Hirschmann Instruments GmbH, Neuried) aufgezogen und versiegelt.

Tabelle 14: PCR-Reaktionsansatz Rapidcycler für 10 µl

	Volumen
10fach Reaktionspuffer	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer (5 mM)	1 µl
rTaq-Polymerase (0,4 U/µl)	1 µl
Wasser für die Molekularbiologie	4 µl
DNA-template	1 µl

Die Polymerase wurde vor dem Einsatz in den Mastermix mit dem Enzymdiluenten verdünnt.

Hierfür wurden 11,5 Teile Diluent mit 1 Teil Taq-Polymerase vermischt.

Folgende Temperaturprotokolle wurden verwendet.

15 Sekunden	94 ° C	
0 Sekunden	95 ° C	} 35 Zyklen
5 Sekunden	54 ° C (Gao A)	
	63 ° C (Tox 5)	
30 Sekunden	72 ° C	
59 Sekunden	30 ° C	

Programmeinstellung: slope: 9,9

2.2.3.4. PCR-Protokoll zur Detektion von *F. graminearum* mit markierten Primern

Zur Detektion von *F. graminearum* anhand von DNA Detection Test Strips™ muss das PCR-Produkt während der PCR wahlweise mit Digoxigenin oder mit Biotin markiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde Digoxigenin verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.1. beschrieben. Abweichend davon wurden Digoxigenin-markierte GaoA-Primer verwendet.

2.2.4. Detektion von PCR-Produkten im Agarosegel

Zur Überprüfung der PCR-Produkte im Agarosegel wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl Stop-Puffer gemischt und auf 1,3 % bzw. 2 %ige Agarosegele aufgetragen.

Die Agarosegele wurden mit 0,5fachem TBE-Puffer angesetzt, der auch als Laufpuffer diente. Die Elektrophorese lief 90 Minuten bei 3,6 V/cm. Die DNA wurde danach mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem Video Imaging System (Herolab, Wiesloch), die Bildverarbeitung mit Photoshop D1-4.0.1. (Adobe) bzw. mit Photo Draw 2000 (Microsoft).

2.2.5. Detektion von PCR-Produkten mittels DNA Detection Test Strips™

Die Detektionsmethode für PCR-Produkte mit DNA Detection Test Strips™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurde anhand des PCR-Systems für *F. graminearum* durchgeführt. Eine Voraussetzung ist die vorangehende Markierung des PCR-Produktes während der PCR, in diesem Fall mit Digoxigenin (Kapitel 2.2.3.4.). Anschliessend erfolgt eine Hybridisierung mit einer sequenzspezifischen Sonde, die mit Biotin verbunden ist. Die 'GaoA Sonde Bio' (50 µmol l⁻¹) (Niessen et al. 1998) wurde zuvor zehnfach mit 4*SSC-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 9 µl der PCR-Lösung mit 1 µl der Sondenlösung vermischt. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 Minuten, wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gestellt. Darauf folgend wurden 5 µl des Ansatzes auf den dafür vorgesehenen Bereich des Test Strips™ gegeben. Der Test Strip™ wurde entsprechend den Herstellerangaben fünf Sekunden in den dafür vorgesehenen Chromatographie-Puffer gestellt

und entwickelt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Video Imaging System (Herolab, Wiesloch), die Bildverarbeitung mit Photoshop D1-4.0.1. (Adobe) bzw. mit Photo Draw 2000 (Microsoft).

2.2.6. Strand Displacement Amplification (SDA)

Es wurden mehrere Amplifikationssysteme mit unterschiedlichen Enzymen und Pufferzusammensetzungen untersucht. Die zwei verwendeten Primer-Paare S1/S2 und Tox5-1/B2 wurden vor der eigentlichen Versuchsdurchführung getrennt voneinander in einer PCR auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Die Auswertung erfolgte in einem 2%igen Agarosegel mit anschließender Färbung mit Ethidiumbromid (siehe 2.2.4.).

Tabelle 15: Verwendete SDA-Puffer

	Klenow-Puffer	Puffer I	Puffer II	Puffer III	Puffer IV	NEB II*	ThermoPol*
Tris-HCl	10 mM					10 mM	20 mM
MgCl₂	5 mM	5 mM		50 mM		10 mM	
MgSO₄							2 mM
Dithiothreitol	7,5 mM					1 mM	
BSA		20 µg/ml		1 mg/ml			
KCl		40 mM	40 mM				10 mM
Glycerin		5 %	5 %		5 %		
DMSO		3 %	3 %		3 %		
NaCl						50 mM	
(NH₄)₂SO₄							10 mM
Triton X-100							0,1 %
K_iPO₄					0,05 M		

* vom Hersteller (New England Biolabs, Inc.) mitgelieferte und empfohlene Puffer

2.2.6.1. Reaktionsansatz 1 mit Ava I und exo^- -Klenow-Fragment

Klenow-Puffer	1 x
dATP α S	1,4 mM
dTTP, dGTP, dCTP	je 0,2 mM
primer SDA-S1 v	0,5 μ M
primer SDA-S2 r	0,5 μ M
primer Tox 5-1	0,05 μ M
primer SDA-B2 r	0,05 μ M
H ₂ O	auf 50 μ l auffüllen

Versuchsdurchführung:

→ **4 Minuten 94 °C**

→ **4 Minuten 37 °C**

Zugabe von:

exo^- -Klenow Fragment 5 U

Ava I 3 U/ μ l

Amplifikation bei:

→ **15 Minuten 37 °C**

→ **5 Minuten 95 °C**

2.2.6.2. Reaktionsansatz 2 mit BsoB1 und Bst⁻-Polymerase

Puffer 1	1 x
dATP α S	1,4 mM
dTTP, dGTP, dCTP	je 0,2 mM
primer SDA-S1 v	0,4 μ M
primer SDA-S2 r	0,4 μ M
primer Tox 5-1	0,08 μ M
primer SDA-B2 r	0,08 μ M
H ₂ O	auf 40 μ l auffüllen

Versuchsdurchführung:

→ **2 Minuten 95 °C**

→ **5 Minuten 61 °C**

Zugabe von:

exo ⁻ - Bst-Polymerase	8 U
BsoB1	10 U
NEB II Puffer	0,2 μ l
ThermoPol Puffer	0,6 μ l
H ₂ O	7,2 μ l

Amplifikation bei:

→ **30 Minuten 61 °C**

→ **2 Minuten 95 °C**

2.2.6.3. Variationen der Puffersysteme ausgehend vom 2. Reaktionsansatz

Tabelle 16: Puffervariationen

<i>2.Reaktionsansatz</i>	<i>Variation 1</i>	<i>Variation 2</i>
Puffer I	Puffer II	Puffer IV
NEB II Puffer	NEB II Puffer	NEB II Puffer
ThermoPol Puffer	Puffer III	Puffer III

Darüber hinaus wurden verschiedene Konzentrationsstufen von Glycerol (0- 20 %) bzw. DMSO (0- 20 %) getestet.

2.2.6.4. Variation der Inkubationszeiten und -temperaturen ausgehend vom 2. Reaktionsansatz

Die Amplifikation wurde innerhalb 30, 45 oder 60 Minuten durchgeführt. Zur Bestimmung der optimalen Temperatur wurde eine Spanne von 60 – 65 ° C in unterschiedlichen Ansätzen getestet.

2.2.7. Variation von Kultivierungsbedingungen zur Analyse der Mykotoxinbildung und Genexpression

Um die Mykotoxinbildung und die Expression des Tri5-Gens zu untersuchen, wurden verschiedene *Fusarium*-Arten bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen beobachtet. Um geeignete Kandidaten für solche Untersuchungen zu finden, wurde zunächst ein Screening von Stämmen auf Mykotoxinproduktion durchgeführt.

2.2.7.1. Test von *F. culmorum* und *F. graminearum* auf Mykotoxinbildung

In der folgenden Tabelle 17 werden die verwendeten Stämme aufgeführt, die auf Mykotoxinbildung untersucht wurden.

Tabelle 17: Verwendete Stämme zur Untersuchung auf Mykotoxinbildung

<i>Stamm</i>	Bezeichnung
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0748
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0747
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0754
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0193
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0302
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0177
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0169
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0185
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0131
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0122
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4529
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4527

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Gewebekulturen, Braunschweig
TMW: Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie der TU München, Freising-Weihenstephan

2.2.7.2. Versuche zur Auswahl von geeigneten Kultivierungsmedien

Um geeignete Kulturmedien zu finden, die die Mykotoxinbildung bei *Fusarium*-Arten fördern, wurden drei verschiedene Medien mit dem Stamm *F. graminearum* DSM 4527 getestet. Es wurden immer Flüssigmedien eingesetzt. Zum einen wurde GYEP-Medium mit zwei unterschiedlichen Glucose- Konzentrationen (2,5 g/l; 10 g/l) eingesetzt, zum anderen ein modifiziertes Reismehlmedium (Misra 1979). Die Inkubation der Pilze in den Medien erfolgte im Dunkeln bei 15 °C und 28 °C.

2.2.7.3. Versuche zum Vergleich der Expression des Tri5-Gens mit der Mykotoxinbildung

Die Versuche wurden mit *F. graminearum* TMW 4.0122 und *F. culmorum* TMW 4.0754 durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in GYEP-Medium mit 2,5 oder 10 g/l Glucose im Dunkeln. Die Temperatur variierte zwischen 10 °C und 28 °C.

Tabelle 18: Versuchsschema Mykotoxinbildung

<i>F. graminearum</i> TMW 4.0122	
2,5 g/l Glucose	
15 °C	28 °C
<i>F. culmorum</i> TMW 4.0754	
2,5 g/l Glucose	
10 °C	28 °C
10 g/l Glucose	
28 °C	

Im 24-Stunden-Rhythmus wurden Proben zur RNA- und Mykotoxin-Extraktion entnommen. Die Versuchsdauer betrug zwischen 14 und 31 Tagen.

2.2.8. Qualitative Analyse von Mykotoxinen mittels Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Analyse der Mykotoxine Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol und 15-O-Acetyl-4-Deoxynivalenol wurde Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

2.2.8.1. Extraktion von Mykotoxinen aus Kulturüberstand für die Dünnschichtchromatographie

Es wurden 50 ml des Kulturüberstandes mit 50 ml Ethylacetat versetzt und in einem Scheidetrichter extrahiert. Die dabei entstehende organische Phase wurde in einem Rotationsverdampfer bei 60 °C getrocknet und der Rückstand in 500 µl Methanol gelöst.

2.2.8.2. Durchführung der Dünnschichtchromatographie

Die zu untersuchenden Proben wurden neben den geeigneten Mykotoxinstandards punktförmig mit geeichten Glaskapillaren (Blaubrand) auf Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Fließmittel wurde Chloroform:Methanol 9:1 verwendet. Zur Detektion wurde eine Aluminiumchloridlösung (1 g AlCl₃ in 100 ml EtOH) aufgesprüht und die Platte 30 Minuten bei 120 °C getrocknet. Die hierbei entstehende Fluoreszenz der Trichothecene kann mit UV-Licht von 366 nm sichtbar gemacht werden.

2.2.9. Quantitative Analyse von Mykotoxinen mittels HPLC

2.2.9.1. Extraktion von Mykotoxinen aus Kulturüberstand für die HPLC

Es wurden 50 ml des Kulturüberstandes mit 50 ml Ethylacetat versetzt und in einem Scheidetrichter extrahiert. Die dabei entstehende organische Phase wurde in einem Rotationsverdampfer getrocknet und der Rückstand in 10 ml Acetonitril-Wasser-Gemisch (84:16, v/v) gelöst. Zur weiteren Reinigung der Probe wurden MycoSep-DON-Säulen (Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim) verwendet. Es wurden 8 ml der Lösung in die bereitgestellten Reagenzgläser überführt und laut Anleitung vorsichtig durch die Säulen gedrückt. Vom Überstand wurden 4 ml im Rotationsverdampfer bei 60°C eingeeengt und getrocknet. Der verbleibende Rückstand wurde zur Analyse in der HPLC in 1 ml Methanol gelöst.

2.2.9.2. Durchführung der HPLC-Analyse

Zur parallelen Detektion von DON, 3-AcDON und 15-O-AcDON wurde eine Gradientenelution durchgeführt. Folgendes Programm wurde verwendet.

- 11 Min Wasser/Acetonitril, 90/10
- Anstieg in 4 Min Wasser/Acetonitril, 75/25
- 20 Minuten Wasser/Acetonitril, 75/25
- innerhalb 3 Min auf Wasser/Acetonitril, 90/10
- 7 Min spülen mit Wasser/Acetonitril, 90/10

Das Injektionsvolumen betrug 20 µl bei einer Flussrate von 1 ml/Min und einer Temperatur von 20 °C. Es wurden die UV-Spektren bei 210 und 227 nm aufgenommen.

Zur quantitativen Auswertung wurden aus Mykotoxinstammlösungen (0,2 µg/ml) Eichlösungen hergestellt, die Endkonzentrationen von 20-400 ng umfassten.

2.2.10. RNA-Extraktion aus Pilz-Myzel

Die RNA-Extraktion wurde unter Verwendung des RNA-Extraktionskit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Soweit nicht anders im Text erwähnt, handelte es sich bei allen Lösungen und Puffern um die im Kit mitgelieferten.

2.2.10.1. Vorbereitung der Materialien/Lösungen

Zur Vermeidung eines Abbaus der RNA durch RNAsen müssen alle verwendeten Materialien und Lösungen vorbehandelt, bzw. RNase-frei gekauft werden.

Folgende RNase-freien Materialien wurden verwendet (peqlab GmbH, Erlangen):

- PCR reaction tubes 0,2 ml
- SafeGuard™ Filter Tips
- Multi™ SafeSeal Tubes 1,5 ml

Darüber hinaus wurde ausschließlich RNase/DNase-freies Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf) verwendet.

Mörser, Pistille, Spatel und Löffel wurden über Nacht bei 200 °C gebacken.

Die Arbeitsoberflächen wurden kurz vor Extraktionsbeginn mit einem RNase Dekontaminationsmittel (RNase-Free; BioLogical™ Molecular Reagents, Continental Laboratory Products) behandelt.

Für jede Probe wurde 1 ml RLT-Extraktionspuffer aus dem RNAeasy®-Kit mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt.

2.2.10.2. Durchführung der RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte aus Pilzmyzel, das in Flüssigmedium gewachsen war. Zunächst musste das Pilzmyzel von der Flüssigkeit getrennt werden. Dies erfolgte durch abzentrifugieren und vorsichtiges Abschütten des Überstandes. Erfolgte die weitere Verarbeitung nicht sofort, wurde das verbleibende Myzel bei –80°C eingefroren.

Das Myzel wurde in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser überführt und bis zu einer pulverförmigen Konsistenz zerkleinert. Vier kleine Löffel dieses Pulvers wurden in den vorgelegten RLT-Extraktionspuffer überführt und gut gemischt.

450 µl wurden auf die QIAshredder-Säulen des RNAeasy®-Kit pipettiert und zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Pellet zu zerstören, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 225 µl absoluten Ethanol wurde die Lösung durch Pipettieren vermischt und auf die RNeasy® mini spin column gegeben. Nach kurzem Zentrifugieren (15 s) wurde die Säule mit 700 µl Puffer RW1 gewaschen. Nach 15 s Zentrifugieren wurde die Säule in ein neues 'collection tube' gestellt. Der nächste Waschschrift wurde mit 500 µl des Puffers RPE durchgeführt. Wiederum wurde 15 s zentrifugiert, nochmals 500µl RPE aufpipetiert und 2 Minuten zentrifugiert. In einem neuen 'collection tube' wurde danach 1 Minute trocken zentrifugiert.

Die Elution erfolgte mit 20 µl RNase-freiem Wasser. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt.

Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei –20°C.

2.2.10.3. DNase-Verdau von RNA-Proben

Der DNase-Verdau wurde mit RQ1 RNAfree DNase (Promega GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die RNA-Probe wurde mit 4 µl des beigefügten Reaktionspuffers und 4 µl DNase versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 4 µl der Stoplösung zugegeben. Nach 10 Minuten Wirkzeit bei 65 °C war die Reaktion abgeschlossen.

2.2.11. Quantitative RT-PCR

2.2.11.1. Durchführung der RT-Reaktion

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde die M-MLV Reverse Transkriptase Punktmutante (RNase H Minus; Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Es wurden 1 µl der RNA-Probe mit 1 µl Oligo(dT)15 primer (Stammlösung 500µg/ml, Promega GmbH, Mannheim) und 12 µl H₂O vermischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 70 °C, wurde der Reaktionsmix 5 Minuten auf Eis gestellt.

Anschliessend wurden folgende Komponenten zupipettiert:

1,25 µl dNTP (10mM)

4,25 µl H₂O (RNase-frei)

0,5 µl M-MLV-RT (100 U)

5 µl M-MLV-RT-Puffer

Die Reaktionstemperatur betrug 42 °C für eine Stunde. Zum Abschluss der Reaktion wurde die Lösung 15 Minuten auf 72 °C erwärmt.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei –20°C.

2.2.11.2. Quantitative PCR

Die Amplifikation der RT-Produkte und deren Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des LightCyclerTM- PCR-Systems (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Die PCR kann hierbei in Echtzeit verfolgt werden. Die DNA-Menge wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzfarbstoffmessung, in diesem Fall SYBR[®]Green I, bestimmt.

Die Reaktionen wurden mit dem QuantiTectTM SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für LightCyclerTM PCR

	Volumen
2* QuantiTect Sybr [®] Green PCR Master Mix	10 µl
Primer Bt2 a, bzw. HaTri F (50 pmol/µl)	0,2 µl
Primer Bt2 b, bzw. HaTri R (50 pmol/µl)	0,2 µl
H ₂ O	7,6 µl
RT-Produkt	2 µl

Für die beiden Primer-Paare 'Bta' und 'HaTri' konnte das identische PCR-Programm verwendet werden. Die Reaktionen wurden in LightCycler™-Kapillaren (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt.

Tabelle 20: LightCycler™-Programm

Programm	Start		Zyklen	1
Segment	Temperatur °C	Zeit (s)	Slope (°C/s)	Acquisition mode
1	95	900	20	None

Programm	PCR		Zyklen	40
Segment	Temperatur °C	Zeit (s)	Slope (°C/s)	Acquisition mode
1	94	15	20	None
2	55	25	20	None
3	72	15	20	Single

Programm	Schmelzkurve		Zyklen	1
Segment	Temperatur °C	Zeit (s)	Slope (°C/s)	Acquisition mode
1	95	0	20	None
2	65	10	20	None
3	95	0	0,1	Continuous

Programm	Ende		Zyklen	1
Segment	Temperatur °C	Zeit (s)	Slope (°C/s)	Acquisition mode
1	40	10	20	None

Für die Quantifizierung wurde eine DNA-Verdünnungsreihe von *F. culmorum* TMW 4.0754 bzw. *F. graminearum* TMW 4.0122 verwendet. Als Negativkontrolle diente das mitgelieferte Wasser des Kits. Für die Auswertung wurde die LightCycler™-Software Version 5.32 verwendet. Aus der Messung der Standard-DNA wurde eine Kalibrationskurve errechnet, mit der die unbekannt DNA-Mengen berechnet werden konnten.

Einstellungen der Auswertesoftware:

Fluoreszenzkanal F 1 (für SYBR® Green I optimiert)

Quantifizierung: 'Second Derivative Maximum' mit 'Arithmetic Baseline Adjustment'

Schmelzkurve: polynomiale Auswertung

Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurde zunächst eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.4.), danach wurden die Schmelzkurven betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Extraktionsverfahren für *Fusarium*-Arten aus Getreide und Malz

3.1.1. Optimierung des DNA-Extraktionsverfahrens

Für eine vollständige Analyse des Schimmelpilzbefalls von Getreide oder Malz wurden die Proben mit einer Laborscheibenmühle gemahlen. Vor allem bei Untersuchungen mit Malzproben konnten reproduzierbare Ergebnisse nur bei gemahlene Proben erzielt werden. Bei ungemahlene Proben waren die Resultate von Extraktion zu Extraktion verschieden, so dass keine verlässliche Aussage getroffen werden konnte.

Das Extraktionsverfahren musste in verschiedenen Punkten optimiert werden. Die Lysepuffer-Konzentration wurde angepasst. Eine Verdünnung der Stammlösung (3,3fach) mit der doppelten Menge Wasser war für eine erfolgreiche Extraktion ausreichend. Der Zusatz von 50 % Ethanol zum Überstand nach der Ultraschallbehandlung unterstützt die Extraktion der DNA.

Der wichtigste Optimierungsschritt war der Zusatz einer Polyphenol-bindenden Substanz zum Lysepuffer. Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an Polyvinylpyrrolidon ergaben, dass ein Zusatz von 6 % zum Lysepuffer ideal ist.

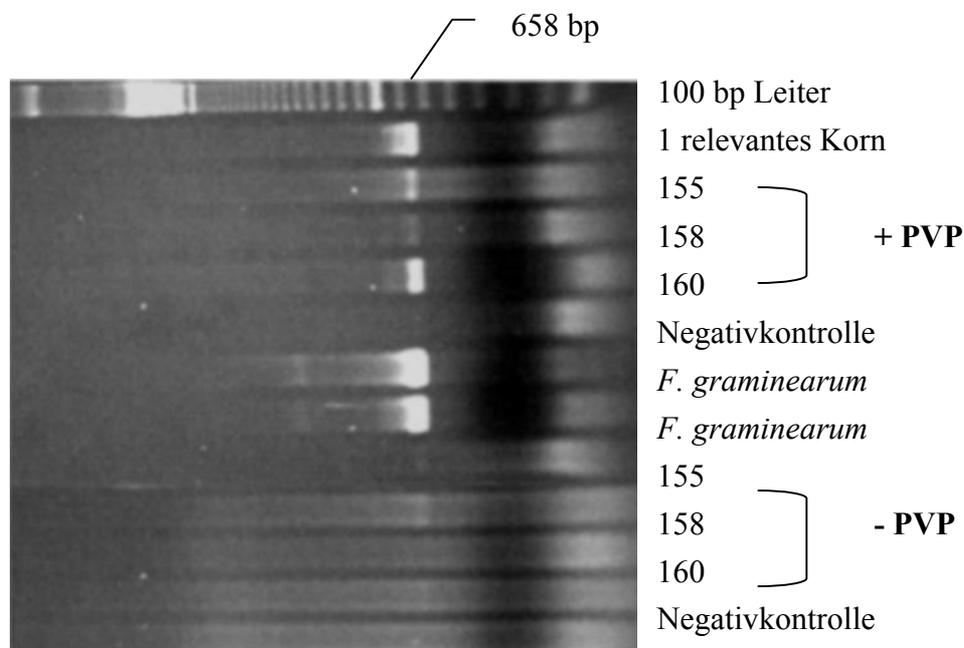


Abbildung 6: Agarosegel mit PCR-Produkten einer Tox5-PCR. Malzproben wurden mit bzw. ohne Zusatz von PVP zum Extraktionspuffer extrahiert. Bei einer Probe handelte es sich um befallsfreien Kontrollweizen mit dem Zusatz eines relevanten Kornes. Negativkontrolle war Wasser.

Mit dem neu entwickelten Protokoll konnte DNA aus Malzproben reproduzierbar extrahiert werden.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft den Vergleich von PCR-Produkten von DNA aus Malzproben, die mit einem Protokoll mit und ohne den oben erläuterten Veränderungen extrahiert wurde. Nur bei Zugabe von 6 % PVP kann ein deutliches Signal gesehen werden.

3.1.2. Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde anhand zweier Weizenproben untersucht, die mit *Fusarium*-Arten unterschiedlich stark kontaminiert waren. Unabhängig voneinander wurde aus jeweils sechs Aliquots die DNA extrahiert. Diese wurde im LigthCycler™ in einer Doppelbestimmung quantifiziert. Der Mittelwert der ersten Weizenprobe ergab einen DNA-Gehalt von 0,027 µg/kg. Die Standardabweichung betrug 14 %. Die DNA-Menge der zweiten Probe lag bei 3,49 µg/kg mit einer Abweichung von 18 %.

3.2. Einsatz des Extraktionsverfahrens an Getreideproben

Das entwickelte DNA-Extraktionsverfahren wurde an rund 600 Getreideproben unterschiedlicher Herkunft angewandt. Tabelle 21 zeigt einen kurzen Überblick über die Art der Proben. Neben natürlich kontaminiertem Getreide, wurden auch künstlich infizierte Proben getestet. Es wurde vorwiegend Weizen und Gerste untersucht, darunter 153 Malzproben. Als Negativkontrolle diente ein Weizen, der nach mikrobiologischer Analyse nicht mit *Fusarium*-Arten und kaum mit anderen Pilzarten kontaminiert war.

Tabelle 21: Untersuchte Getreideproben zur Detektion von *Fusarium*-Arten

<i>Probenart</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Beschreibung</i>
Kontrollweizen	1	Keine Kontamination mit <i>Fusarium</i> -Arten
Versuchsweizen	100	Mit <i>Fusarium</i> -Arten kontaminiert
Weizen	141	Natürlich kontaminiert
Versuchsweizen	21	Künstlich kontaminiert
Mais	9	Natürlich kontaminiert
Malz	41	Industrieproben, natürlich kontaminiert
Getreide	27	Aus Mühle, natürlich kontaminiert
Getreide	135	Industrieproben, natürlich kontaminiert
Malze	112	Gushingproben

3.3. Untersuchungen zur Probenahme in Getreide für die PCR-Analytik

Neben der Genauigkeit der analytischen Methoden zur Detektion von Pilzen in Getreide, muss bestimmt werden, in wieweit die Probenahme des Getreides einen Einfluss auf das Endresultat hat. Zur modellhaften Untersuchung dieser Fragestellung wurden 50 kg mit *F. culmorum* feldinfizierter Gerste verwendet. Mit einem Probestecher wurden mehrfach 200 g gestochen. Für die DNA-Extraktion wurden hieraus 20 g verwendet.

Tabelle 22: Ergebnisse der Probenahmeuntersuchung

Probe	Extraktion 1	Extraktion 2	Mittelwert	Abweichung %
	DNA 1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DNA 2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
1	2213	1709	1961	13
2	1313	2039	1676	22
3	2001	2129	2065	3
4	1728	2566	2147	20
5	1991	1635	1813	10
Mischprobe	1967	1662	1815	8

Fünf Proben wurden untersucht, von den Proben wurde eine Mischprobe hergestellt. Die DNA wurde zweifach im LightCyclerTM quantifiziert

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse einer quantitativen Analyse der extrahierten DNA dargestellt. Der Vergleich zwischen verschiedenen Extraktionen der gleichen Probe ergab Abweichung von 3 – 20 %. Neben den fünf Einzelproben wurde eine Mischprobe aus allen Proben hergestellt. Diese Probe zeigte eine Abweichung von 6 bzw. 21 % zu den Mittelwerten der Einzelproben. Die Werte der ersten Extraktion schwankten um 19 %, die der zweiten um 18 %. Vergleicht man alle Proben miteinander, ergibt sich eine Variation um 17%

3.4. Entwicklung einer Triplex-PCR

Zur simultanen Bestimmung von *F. graminearum*, *F. culmorum* und der Gruppe der Trichothecenbildner wurde ein Triplex-PCR-Protokoll entwickelt. Dabei wurden die drei entsprechenden Primer-Paare in einem Ansatz vereinigt. Durch Optimierung des Reaktionssystems und der Annealing-Temperatur in der PCR, konnten ausreichend sensitive und spezifische Resultate erzielt werden.

3.4.1. Sensitivität der Triplex-PCR

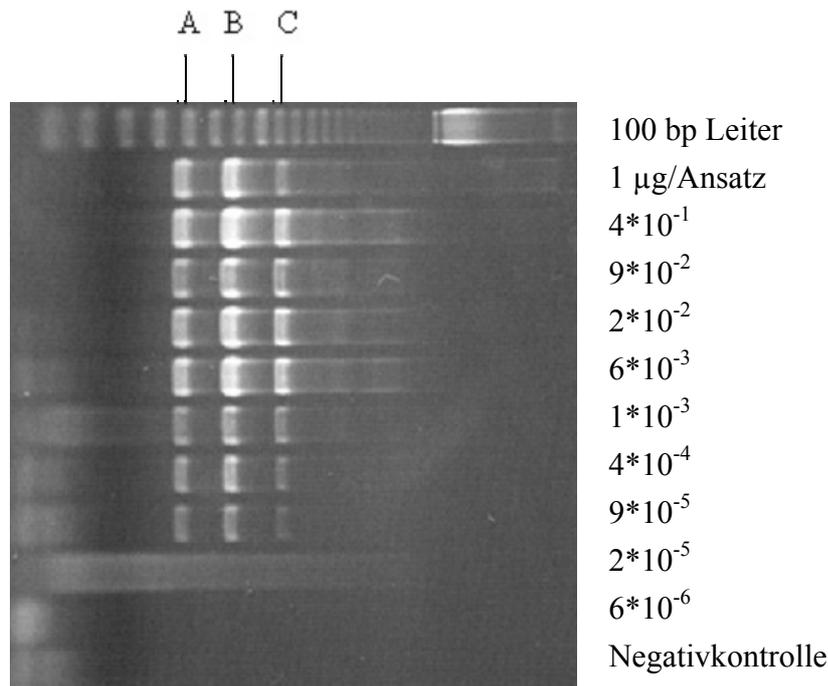


Abbildung 7: Triplex-PCR mit einer *F. graminearum*/*F. culmorum* DNA Verdünnungsreihe. Angegeben ist die Menge an DNA pro Reaktionsansatz. Negativkontrolle war DNAfreies Wasser.

A: 450 bp: *F. culmorum*

B: 658 bp: Trichothecenbildende *Fusarium*-Arten

C: 898 bp: *F. graminearum*

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse der Triplex-PCR, in die eine DNA-Verdünnungsreihe von *F. graminearum* und *F. culmorum* eingesetzt wurde. Die drei Banden für die Detektion von *F. graminearum*, *F. culmorum* und die Gruppe der Trichothecenbildner sind deutlich voneinander unterscheidbar. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Es konnten bis zu $9 \cdot 10^{-5}$ µg DNA in einem Ansatz nachgewiesen werden.

3.4.2. Spezifität der Triplex-PCR

Um die Spezifität der PCR zu überprüfen, wurden 19 Trichothecenbildende *Fusarium*-Arten getestet. Erwartungsgemäss ergaben alle ein positives PCR-Signal, wenn auch unterschiedlich stark. Bei den Ansätzen mit *F. graminearum* und *F. culmorum* konnten jeweils die Bande für den gruppenspezifischen Nachweis, als auch das jeweilige art-spezifische Signal detektiert werden. Bei den anderen Arten war nur die Bande für den gruppenspezifischen Nachweis zu sehen.

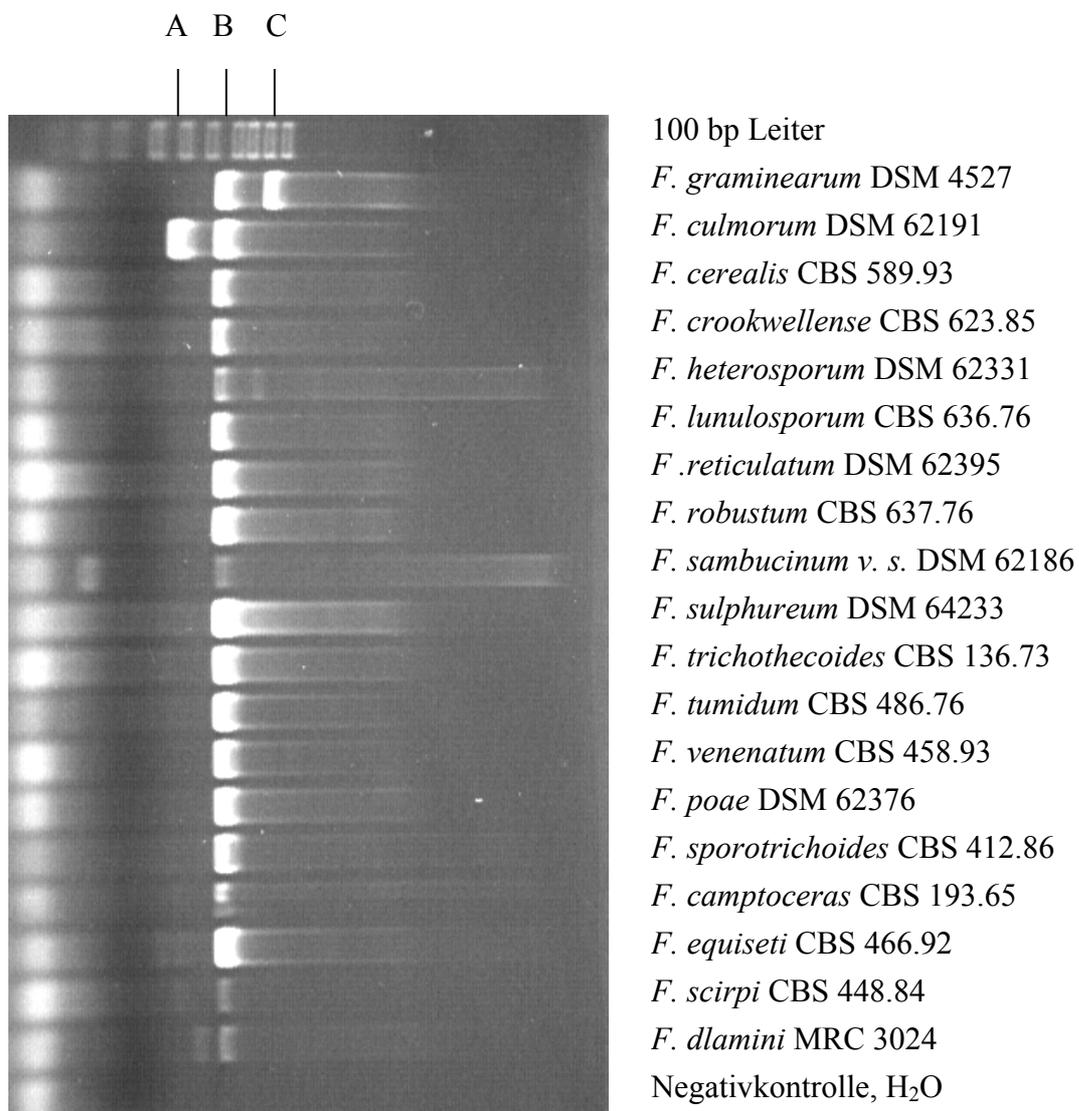


Abbildung 8: Triplex-PCR mit DNA-Isolaten verschiedener trichothecenbildender *Fusarium*-Arten.

A: 450 bp: *F. culmorum*

B: 658 bp: Trichothecenbildende *Fusarium*-Arten

C: 898 bp: *F. graminearum*

Um falsch positive Ergebnisse zu erkennen, wurde DNA verschiedener Pilze, Hefen, Bakterien und Pflanzen in die Triplex-PCR eingesetzt. Abbildung 9 zeigt eine Auswahl getesteter Organismen. Wie erwartet waren nur Signale für die *Fusarium*-Arten zu erkennen.

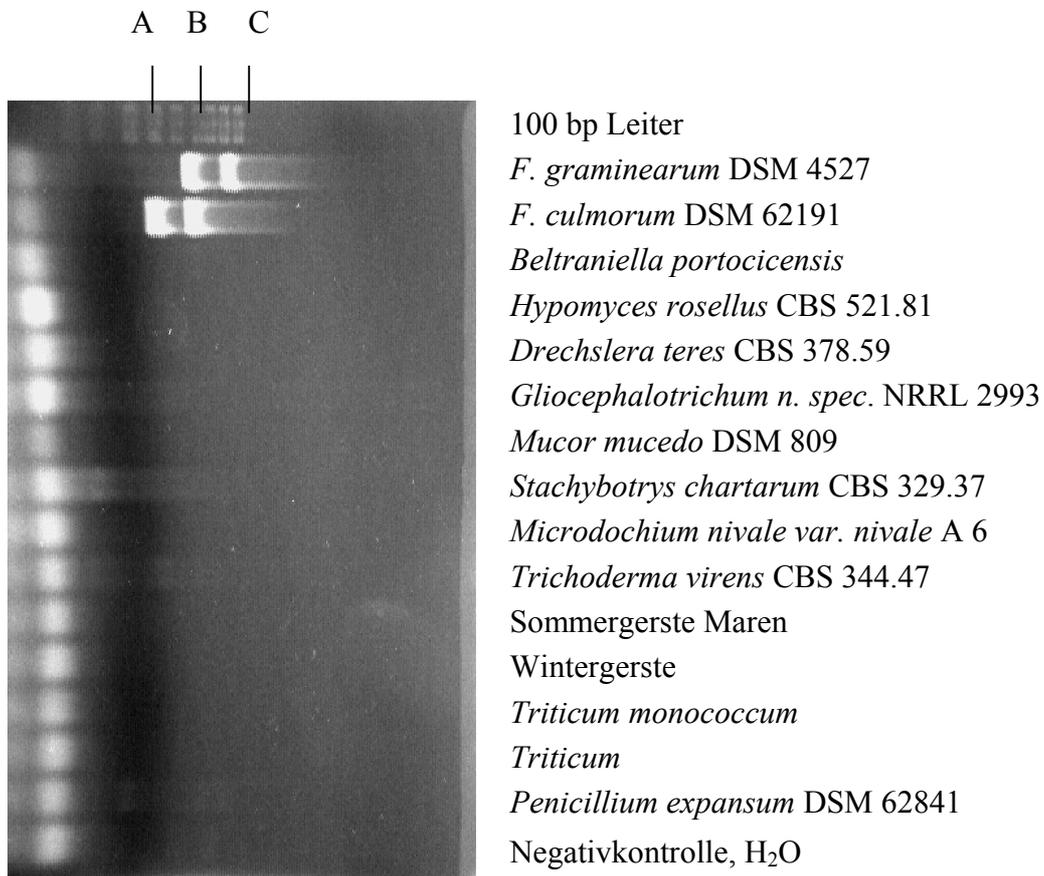


Abbildung 9: Triplex-PCR mit DNA-Isolaten verschiedener Pilze, Bakterien und Getreidepflanzen

A: 450 bp: *F. culmorum*

B: 658 bp: Trichothecebildende *Fusarium*-Arten

C: 898 bp: *F. graminearum*

3.4.3. Anwendung der Triplex-PCR in mit *Fusarium*-Arten kontaminiertem Weizen

Es wurden 100 Weizenproben untersucht, für die mikrobiologische Befallsdaten vorhanden waren. Die Resultate der PCR wurden mit diesen Daten verglichen. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 23: Vergleich zwischen mikrobiologischer Analyse und PCR-Resultat

Detektion von	Konformität Mikrobiologie-PCR	falsch negative Resultate	falsch positive Resultate
Trichothecenbildende <i>Fusarium</i> - Arten	92%	3%	5%
<i>F. graminearum</i>	71%	23%*	6%
<i>F. culmorum</i>	75%	10%*	14%

* 60% (*F. graminearum*) und 70% (*F. culmorum*) dieser Ergebnisse wurden in Proben bestimmt, die geringer als 3 % mit *Fusarium* kontaminiert waren.
(die mikrobiologischen Daten wurden von Dipl.-Ing. Anne Suty (Bayer AG, Leverkusen) zur Verfügung gestellt.)

Die Übereinstimmung zwischen PCR-Signal und Befallsdaten war vor allem bei der Detektion der Gruppe der Trichothecenbildner mit 92 % sehr hoch. Bei *F. graminearum* und *F. culmorum* war die Konformität mit 71 % bzw. 75 % geringer. Allerdings handelte es sich bei den falsch negativen Proben um solche, die eine Kontamination in weniger als drei Prozent der Körner aufwiesen.

3.4.4. Vergleich von PCR-Resultaten mit DON-Konzentrationen in Weizen

Für den Vergleich von PCR-Signalen mit DON-Konzentrationen wurde aus 147 Weizenproben DNA extrahiert und in einer Triplex-PCR untersucht.

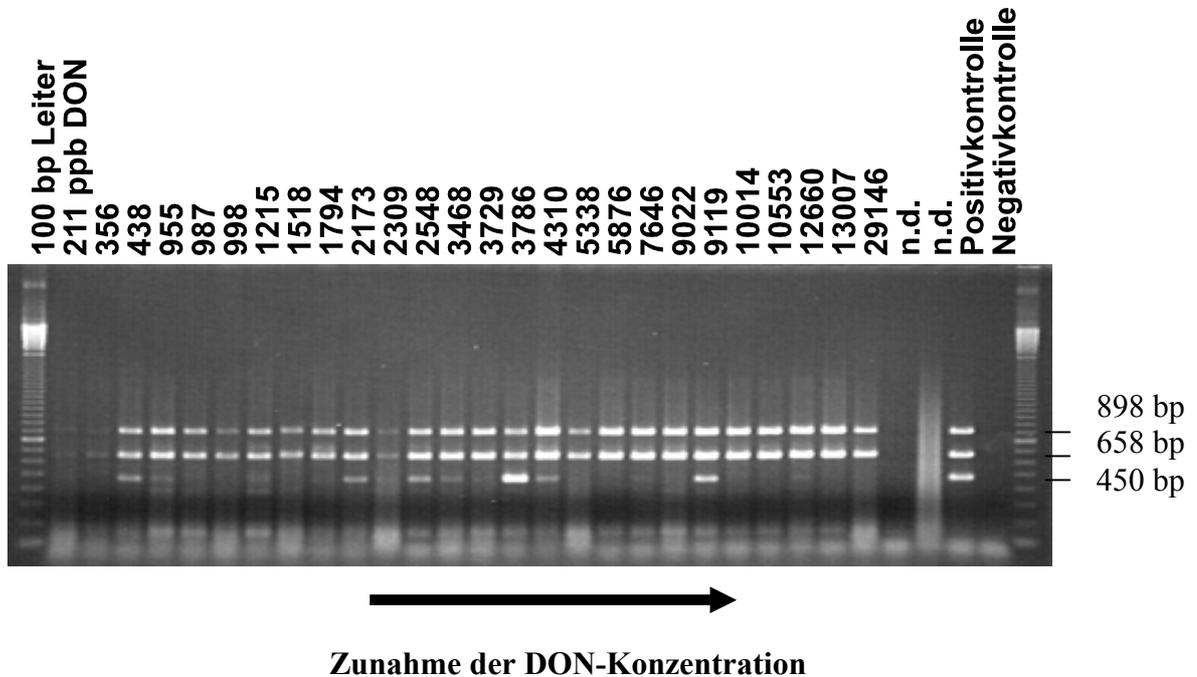


Abbildung 10: Triplex-PCR mit DON-kontaminiertem Weizen. Die Proben sind nach steigendem DON-Gehalt sortiert.

898 bp: *F. graminearum*

658 bp: Trichothecenbildende *Fusarium*-Arten

450 bp: *F. culmorum*

Positivkontrolle: *F. graminearum*/*F. culmorum*-DNA

Negativkontrolle: DNAfreies Wasser

Die Abbildung 10 stellt das Ergebnis der Untersuchung von 28 Weizenproben dar, die DON-Konzentrationen zwischen nicht detektierbar und 29146 ppb aufwiesen. Ab 400 ppb DON konnten deutliche PCR-Banden detektiert werden. In 3 % der Proben wurde ein PCR-Produkt detektiert, obwohl kein DON nachweisbar war, in 6 % der Proben war DON nachweisbar, aber kein PCR-Produkt. Diese Proben wiesen alle DON-Konzentrationen kleiner 400 ppb auf. Zwischen dem Auftreten eines PCR-Signals für *F. graminearum* bzw. der Gruppe der Trichothecenbildner und dem Vorkommen von DON konnte ein positiver Zusammenhang gesehen werden. Für *F. culmorum* war dies nicht der Fall.

3.5. Entwicklung einer Rapidcycler-PCR

Um den Zeitaufwand der Detektion von *Fusarium*-Arten zu verringern, wurden PCR-Protokolle für den Einsatz im Rapidcycler entwickelt. Dies umfasste den Nachweis von *F. graminearum* und der Gruppe der Trichothecenbildner.

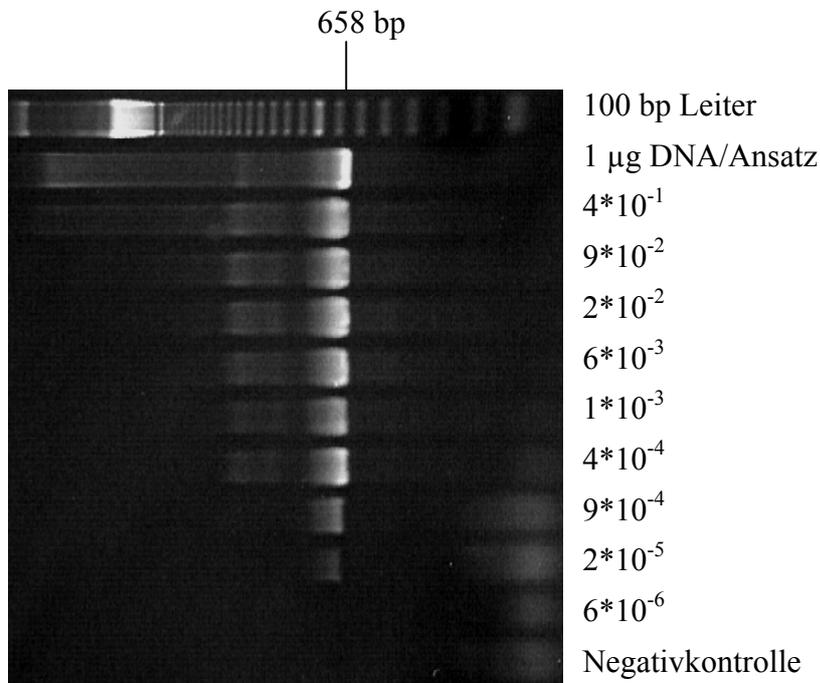


Abbildung 11: Rapidcycler-PCR zum gruppenspezifischen Nachweis von trichothecenbildenden *Fusarium*-Arten. Eine Verdünnungsreihe von *F. graminearum*-DNA wurde eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde DNAfreies Wasser verwendet.

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis einer Rapid-Cycler-PCR im Agarose-Gel. Es wurde eine Verdünnungsreihe von *F. graminearum*-DNA unter Verwendung der Tox5-Primer eingesetzt. Bis zu einer Verdünnung von $9 \cdot 10^{-4}$ µg DNA/Ansatz war deutlich das 658 bp grosse Produkt zu erkennen. Bei einer DNA-Menge von $2 \cdot 10^{-5}$ µg war auf dem Gel eine dünne Bande zu sehen. In der Negativkontrolle ohne DNA ist keine Bande zu erkennen.

3.6. Strand Displacement Amplification

Eine einfach zu handhabende und keine aufwendige technische Ausstattung benötigende Methode zur Amplifikation von DNA stellt das Verfahren 'Strand Displacement Amplification' dar. Um diese Methode für die Detektion von *Fusarium*-Arten anzuwenden, wurden unterschiedlichste Ansätze gewählt.

Zunächst wurden die Primer-Paare in einer herkömmlichen PCR auf ihre Bindungsaffinität und -spezifität getestet. Es konnten die erwarteten Banden detektiert werden. Darüber hinaus wurde die Verwendung von dATP α S als Nukleotid in der PCR getestet. Es konnte kein Unterschied im Vergleich mit dem Einsatz des unmodifizierten Nukleotids dATP gesehen werden.

Im ersten Ansatz wurden das Restriktionsenzym Ava I mit dem exo⁻-Klenow -Fragment kombiniert. Im zweiten Ansatz wurden das Restriktionsenzym BsoB1 und die Bst⁻-Polymerase verwendet. Beide Reaktionen wurden sowohl in von den Herstellern mitgelieferten, als auch in der Literatur zitierten Puffern durchgeführt. Darüber hinaus wurden Puffervariationen untersucht. Unterschiedliche Amplifikationszeiten und Reaktionstemperaturen wurden getestet.

Keine der gewählten Ansätze bzw. Massnahmen ergab ein verwertbares Ergebnis. Die eingesetzte *Fusarium*-DNA konnte nicht amplifiziert werden. Eine Anwendung dieser Methode für die Detektion von *Fusarium*-Arten war nicht möglich.

3.7. Einsatz von DNA Detection Test StripsTM zur Detektion von *F. graminearum*

3.7.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Zur Detektion von PCR-Produkten wurde eine zur Agarose-Gelelektrophorese alternative Methode erprobt. Es handelte sich dabei um den Einsatz von DNA Detection Test StripsTM. Stellvertretend für alle in dieser Arbeit angewandten PCR-Protokolle, wurde der Nachweis mit PCR-Produkten für *F. graminearum* durchgeführt.

Verschiedene Reaktionsbedingungen wurden untersucht. Zur Detektion von *Fusarium*-DNA aus Getreideproben wurde ein optimiertes Protokoll entwickelt. Die Verwendung einer 3'- und 5'-markierten Sonde ergab wesentlich bessere Resultate als der Einsatz nur einer einfach markierten Sonde. Die Sensitivität wurde erhöht durch Optimierung der Sonden-Konzentration auf 0,5 μ mol/l. Die Verdünnung der Sonde in 4* SSC-Puffer brachte bessere Resultate als eine Verdünnung in Wasser. Vor allem bei geringeren DNA-Konzentration war diese Massnahme notwendig, um deutliche Signale zu erhalten. Die Hybridisierung erfolgte schneller und besser bei 5minütiger Inkubation auf Eis anstatt 10-30 Minuten bei 37 °C, wie es der Hersteller empfiehlt.

3.7.2. Sensitivität der DNA Detection Test Strips™

Die Sensitivität der DNA Detection Test Strips™ wurde verglichen mit einer Detektion im Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung.

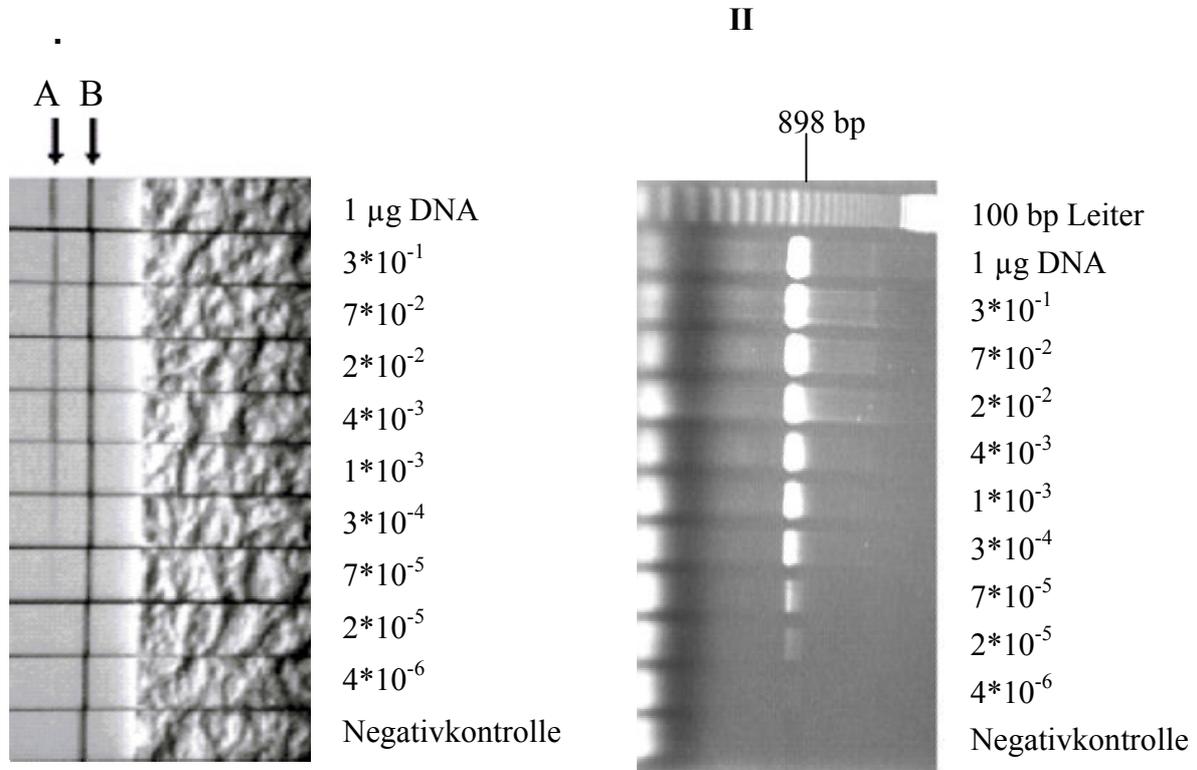


Abbildung 12: Vergleich der Detektion von PCR-Produkten im Agarosegel und mit DNA Detection Test Strips™. Eine Verdünnungsreihe von *F. graminearum* DSM 4527 wurde für die PCR verwendet. DNAfreies Wasser diente als Negativkontrolle.

I: DNA Detection Test Strips™

A: Signal eines PCR-Produkts: Streptavidin-Linie

B: Signal der internen Kontrolle: Immuno-Gold-markierter Anti-Maus-Antikörper

II: Agarosegel mit Ethidiumbromidgefärbten PCR-Produkten

Die PCR-Produkte einer DNA-Verdünnungsreihe von *F. graminearum* wurden parallel im Agarose-Gel (Abb. 12 II) bzw. mit den Test Strips™ (Abb. 12 I) untersucht. Ein deutliches Signal konnte bei den Test Strips™ bis $3 \cdot 10^{-4}$ µg DNA detektiert werden. Mit dem bloßen Auge konnte aber auch noch bei geringeren Konzentrationen bis $4 \cdot 10^{-6}$ im Vergleich mit der Nullkontrolle eine dünne Bande gesehen werden. Im Gel war ein deutlich sichtbares Signal bis zu einer Konzentration von $7 \cdot 10^{-5}$ µg DNA vorhanden. Eine dünne Bande war noch bei einer DNA-Menge von $2 \cdot 10^{-5}$ µg erkennbar.

3.7.3. Anwendung der Test Strips™ an DNA aus kontaminiertem Getreide

Aus 60 Getreideproben wurde DNA extrahiert und in einer für *F. graminearum* spezifischen PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden sowohl in einem Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung als auch mit DNA Detection Test Strips™ detektiert. Der mikrobiologische Status dieser Proben war bekannt und die Proben konnten anhand des Ausmasses des Befalls mit *F. graminearum* eingeteilt werden. Der Vergleich der Ergebnisse der Detektion im Agarose-Gel bzw. mit den Test Strips™ ist in Abbildung 13 dargestellt.

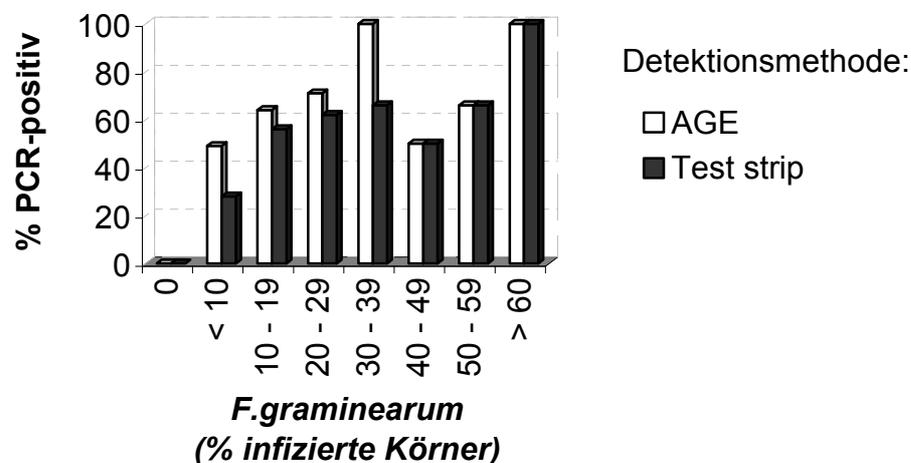


Abbildung 13: Vergleich der Detektion von *F. graminearum* aus Getreideproben im Agarose-Gel und mit DNA Detection Test Strips™. Die Einteilung der Proben erfolgte anhand ihrer prozentualen Kontamination. □ AGE = Agarose-Gelelektrophorese, ■ DNA Detection Test Strips™.

Proben, die keine nachweisbare Infektion mit *F. graminearum* aufwiesen, zeigten weder im Agarose-Gel noch mit den Test Strips™ ein Signal. In Proben mit einer Infektionsrate bis 40 % war die Detektion von PCR-positiven Resultaten im Agarose-Gel höher als mit den Test Strips™. Bei Proben mit 1-30 % infizierter Körner, war das Ergebnis im Agarose-Gel 10 % höher als mit den Teststäbchen. In höher kontaminierten Proben waren die Resultate mit beiden Methoden identisch.

3.8. Vergleich der mit PCR nachgewiesener *Fusarium*-Kontamination und dem Gushing-Test

Ziel der Untersuchung war festzustellen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der mit PCR nachgewiesener Kontamination von Malzen mit *Fusarium*-Arten und den Ergebnissen aus dem Gushing-Test. Aus 98 Malzproben wurde DNA extrahiert und mit PCR ein Vorkommen von Trichothecenbildnern bestimmt. Das Überschäumvolumen der Malze in einem Gushing-Test betrug zwischen 8 ml und 233 ml.

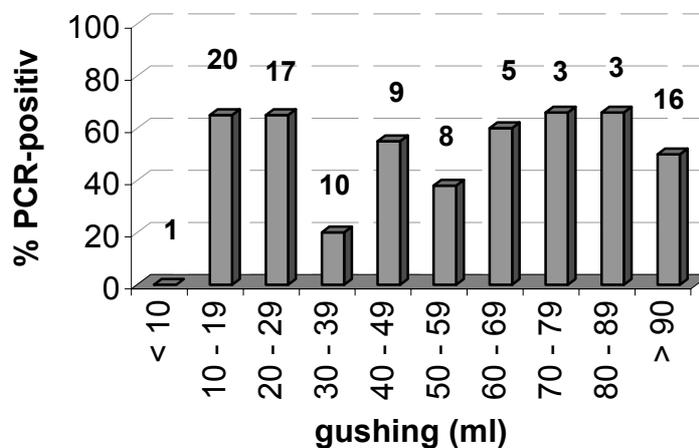


Abbildung 14: Vergleich Gushing-Volumen mit PCR-Ergebnissen. Die PCR positiven Resultate (■) der jeweiligen Proben sind prozentual dargestellt. Über den Balken steht jeweils die Anzahl der untersuchten Malze.

gushing (ml)	PCR-positiv (%)	n
< 10	0	1
10 - 19	65	20
20 - 29	65	17
30 - 39	20	10
40 - 49	55	9
50 - 59	38	8
60 - 69	60	5
70 - 79	66	3
80 - 89	66	3
> 90	50	16

Tabelle 24: Prozentuale Auswertung der PCR-Ergebnisse im Vergleich mit dem Gushing-Volumen. n = Anzahl der untersuchten Malzproben

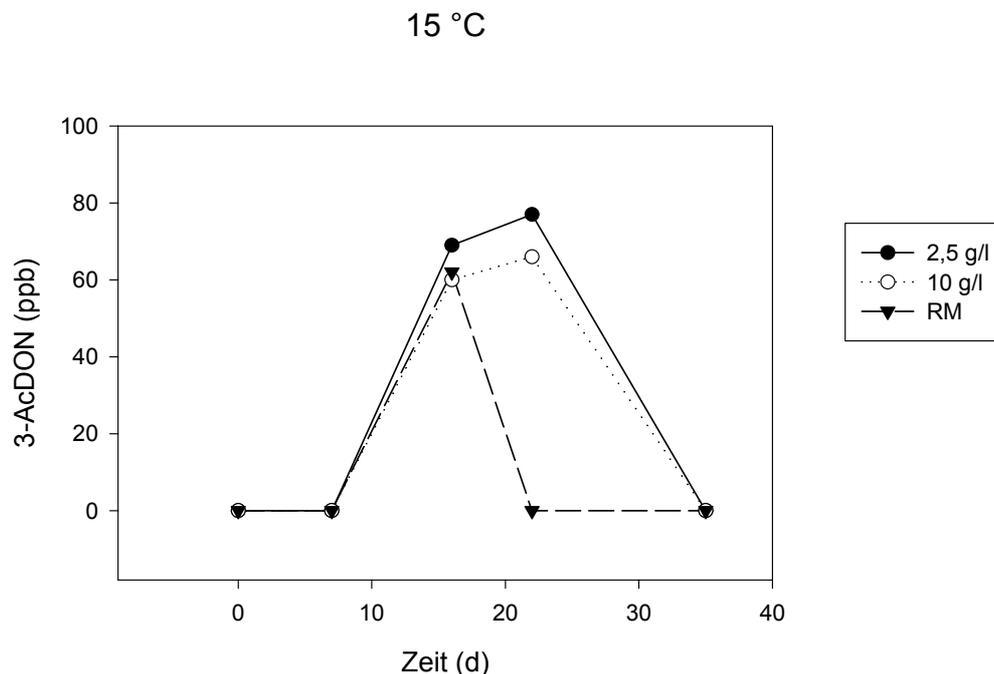
Fasst man alle Ergebnisse zusammen, zeigte sich, dass bei 49 % der Proben, die ein positives Gushingtest-Ergebnis zeigen, auch ein positives PCR-Signal zu sehen war. Es wurde nur eine Probe unter 10 ml Überschäumvolumen untersucht. Wird diese aus der Auswertung genommen, so ergibt sich ein Wert von 54 %. In den unterschiedlichen Gruppen wurden Übereinstimmungen von 20 % bis zu 66 % bestimmt. Die 16 Malze mit den höchsten Überschäumvolumina zwischen 90 ml und 233 ml hatten mit PCR nachgewiesene *Fusarium*-Kontaminationen von 50 %. Es ist keine Korrelation vorhanden zwischen der nachgewiesenen *Fusarium*-DNA und der in einem Gushing-Test ermittelten Gushing-Neigung der Malze.

3.9. Analyse der Mykotoxinbildung und Vergleich mit der Genexpression des *Tri5*-Gens

3.9.1. Einfluss von Kulturmedien auf die Mykotoxinbildung

Der Stamm *F. graminearum* DSM 4527 wurde in unterschiedlichen Kulturmedien bis zu 35 Tage inkubiert. Das Wachstum erfolgte jeweils bei 15 °C und 28 °C. Es wurden Proben entnommen zur Extraktion für die Dünnschichtchromatographie bzw. HPLC-Analyse. Die Dünnschichtchromatographie sollte als schnelles Screening dienen, ob Mykotoxine gebildet wurden. Die Ergebnisse waren aber oft nicht eindeutig, so dass in der Regel die Proben in der HPLC untersucht wurden.

A



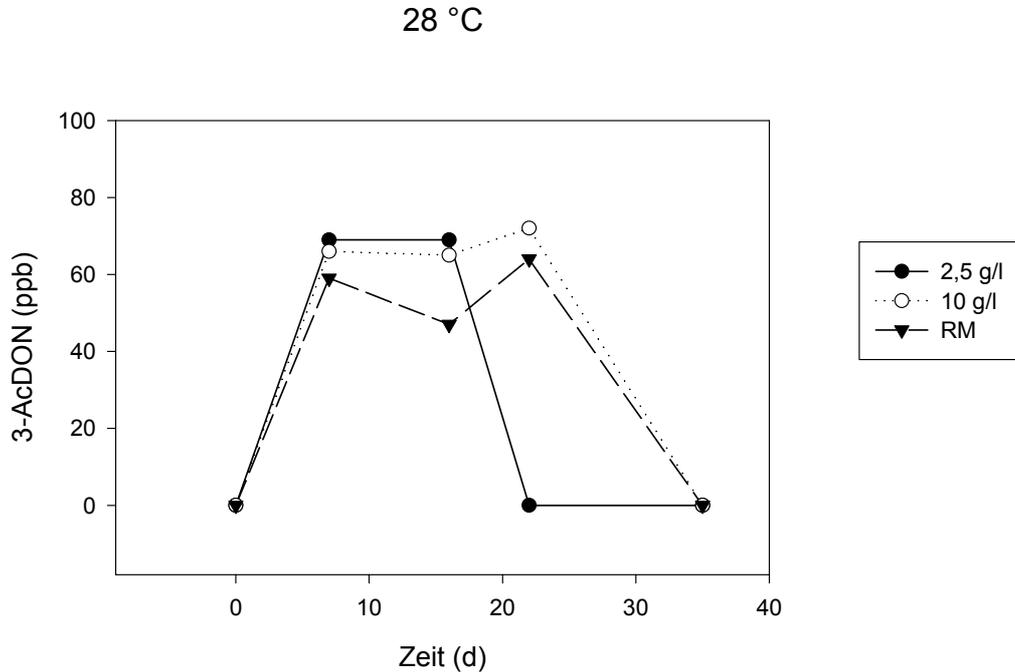
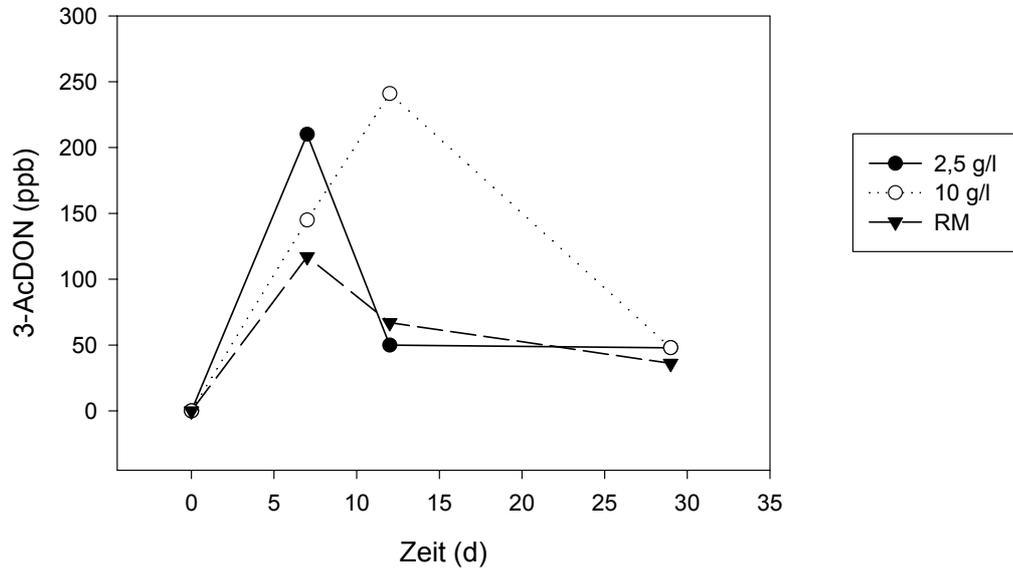
B

Abbildung 15: Bildung von 3-AcDON durch *F. graminearum* DSM 4527 in unterschiedlichen Kulturmedien: 2,5 g/l Glucose, 10 g/l Glucose, Reismehlmedium (RM) und bei 15 °C (A) bzw. 28 °C (B).

In der Abbildung 15 werden die Ergebnisse eines ersten Versuchsdurchganges dargestellt. Der Verlauf der Bildung von 3-AcDON wird gezeigt. Die gebildeten Toxinmengen überstiegen bei 15 °C 70 ppb nicht (A). In den GYEP-Medien wurde unabhängig vom Glucose-Gehalt zur gleichen Zeit die gleichen Mengen an 3-AcDON gebildet. Im Reismehlmedium wurde zunächst ebenfalls 3-AcDON produziert, das danach jedoch schnell abnahm. Bei 28 °C ergaben sich unregelmässige Verläufe (B). In den ersten sieben Tagen stieg die Bildung an, um dann in den GYEP-Medien nach 16 bzw. 22 Tagen zu sinken. In Reismehlmedium war der Verlauf ähnlich wie in dem Medium mit 2,5 g/l Glucose. DON konnte nur zu einem Zeitpunkt detektiert werden. Nach 22 d Inkubation bei 28 °C in Reismehlmedium wurde 300 ppb DON nachgewiesen.

A

15 °C



B

28 °C

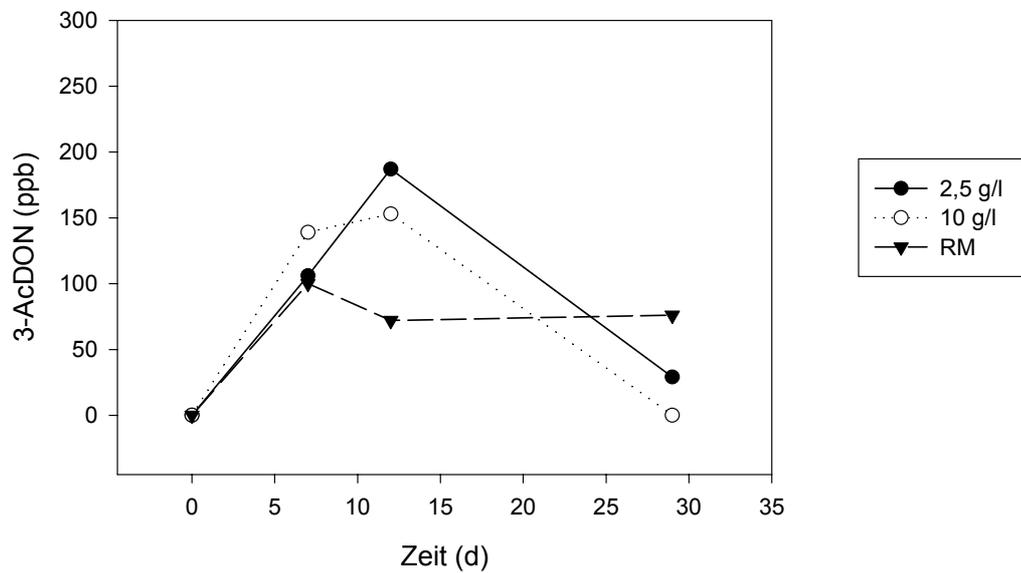


Abbildung 16: Bildung von 3-AcDON durch *F. graminearum* DSM 4527 in unterschiedlichen Kulturmedien: 2,5 g/l Glucose, 10 g/l Glucose, Reismehlmedium (RM) und bei 15 °C (A) bzw. 28 °C (B).

Eine Wiederholung der Versuche ergab insgesamt höhere Toxingehalte bis rund 200 ppb. Bei einer Temperatur von 15 °C wurde nach 7 – 12 Tagen in allen drei Ansätzen 3- AcDON gebildet, das danach jedoch schnell wieder abnahm. Eine Inkubation bei 28 °C resultierte im Reismehlmedium in einem fast identischen Verlauf der Toxinbildung. Bei den GYEP-Medien stieg die Menge an 3-AcDON bis zum 12. Tag an und verringerte sich danach wieder. DON konnte nur zweimal nachgewiesen werden. Im GYEP-Medium mit 10 g/l Glucose wurde nach 29 Tagen bei 15 °C 94 ppb nachgewiesen, im Reismehlmedium nach 7 d bei 28 °C 34 ppb.

3.9.2. Screening von *Fusarium*-Stämmen auf Mykotoxinbildung

Um für weiterführende Untersuchungen geeignete Kulturen zu finden, wurden verschiedene *Fusarium*-Stämme auf Mykotoxinbildung untersucht. Diese sind in Tabelle 25 kurz aufgeführt. Die Inkubation der Stämme erfolgte bei 2,5 g/l Glucose bei 28 °C im Dunkeln.

Tabelle 25: *Fusarium*-Stämme, die auf Mykotoxinbildung getestet wurden

Stamm	Bezeichnung
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0748
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0747
<i>Fusarium culmorum</i>	TMW 4.0754
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0177
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0169
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0185
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0131
<i>Fusarium graminearum</i>	TMW 4.0122
<i>Fusarium graminearum</i>	DSM 4527

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Gewebekulturen, Braunschweig

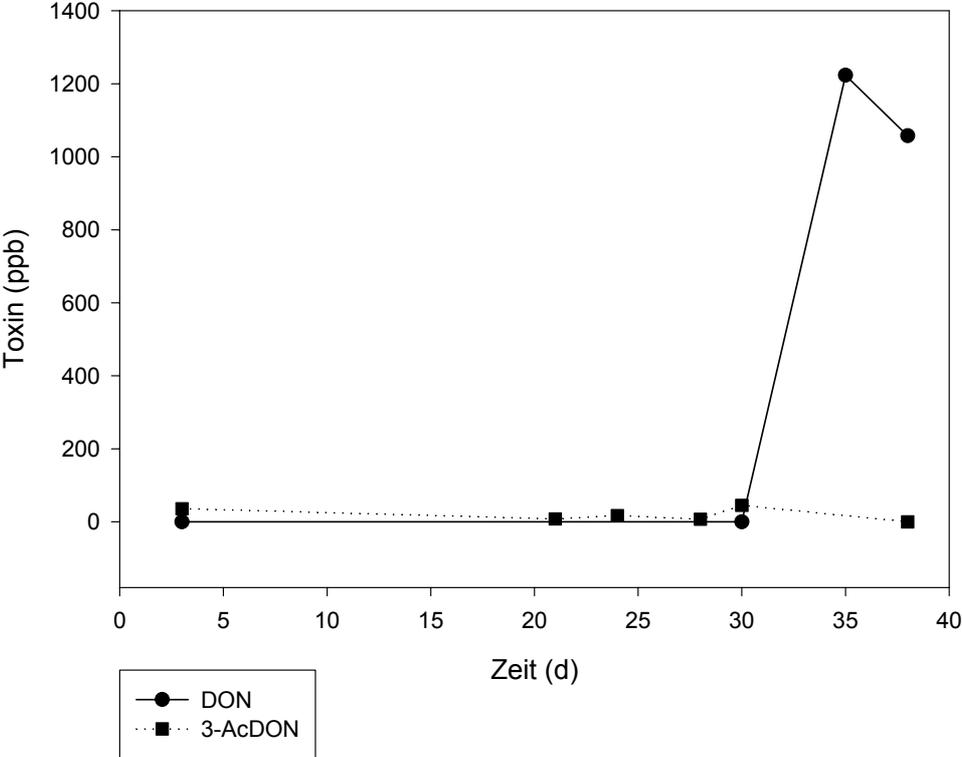
TMW: Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie der TU München, Freising-Weihenstephan

3.9.2.1. Mykotoxinbildung bei *F. culmorum*

Es wurden drei *F. culmorum*-Stämme auf Mykotoxinbildung getestet. Die Mykotoxine DON und 3- AcDON konnten gefunden werden, nie jedoch 15-O-AcDON.

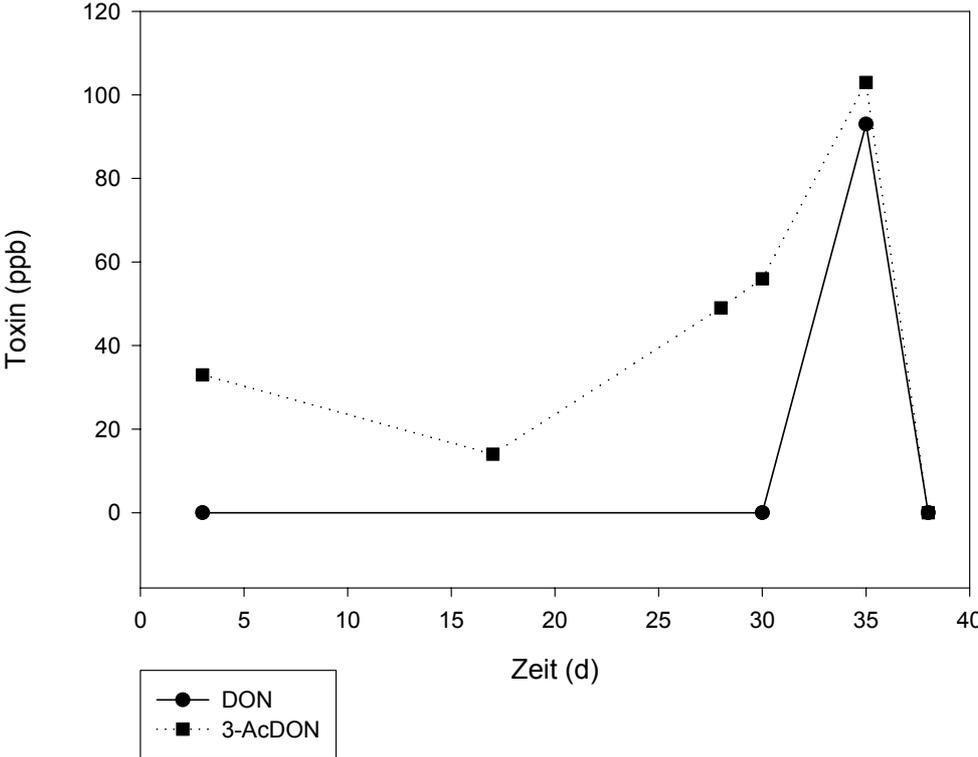
A

F.culmorum TMW 4.0747



B

F.culmorum TMW 4.0748



C

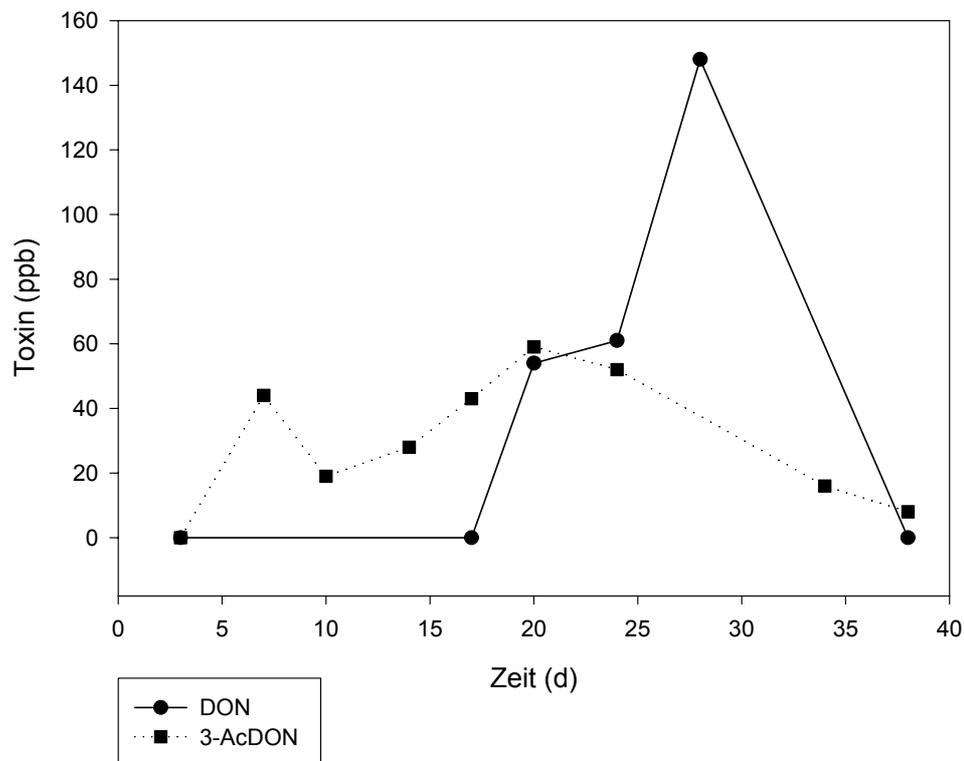
F. culmorum TMW 4.0754

Abbildung 17: Verlauf der Toxinbildung bei *F. culmorum* TMW 4.0747 (A), *F. culmorum* TMW 4.0748 (B), *F. culmorum* TMW 4.0754 (C). Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Stamm *F. culmorum* TMW 4.0747 produzierte von Anfang an geringe Mengen (7-87 ppb) 3-AcDON. DON wurde erst nach 35 Tagen mit einem Wert von 1233 ppb gebildet. *F. culmorum* 4.0748 produzierte zwischen 14 und 103 ppb 3-AcDON und ebenfalls nach 35 Tagen DON, jedoch nur 93 ppb. Der dritte Stamm *F. culmorum* 4.0754 erreichte 8 – 60 ppb 3-AcDON und nach 20 Tagen 54 ppb DON, das nach 28 Tagen auf 148 ppb DON anstieg.

3.9.2.2. Mykotoxinbildung bei *F. graminearum*

Sechs *F. graminearum*-Stämme wurden auf Ihre Produktion von Trichothecenen untersucht. Die Auswertungen umfassten nur DON und 3-AcDON, da nie 15-O-AcDON gefunden wurde.

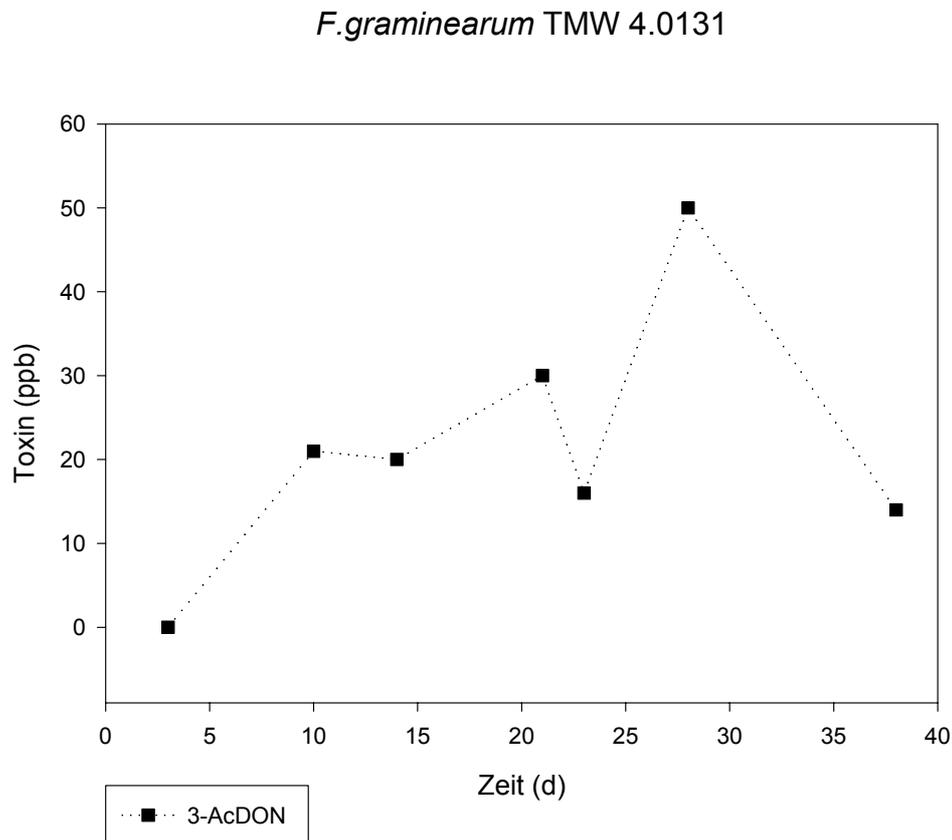


Abbildung 18: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* TMW 4.0131. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Die Versuche mit *F. graminearum* TMW 4.0131 führten zu keiner DON-Bildung. Das Toxin 3-AcDON wurde gebildet, jedoch mit geringen Werten zwischen 10 und 30 ppb. Das Maximum lag bei 50 ppb nach 28 Tagen Inkubation.

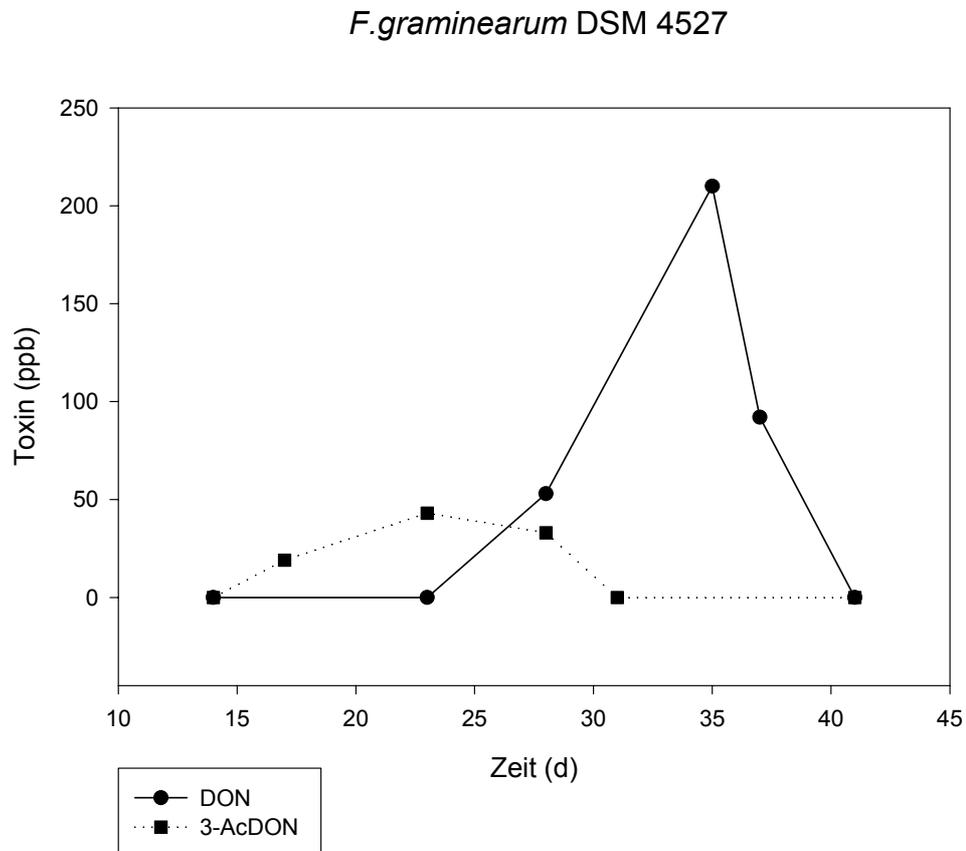


Abbildung 19: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* DSM 4527. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

F. graminearum DSM 4527 zeigte eine geringe 3-Ac-DON-Produktion, die nach 28 Tagen zum Erliegen kam. Zu diesem Zeitpunkt begann die Produktion von DON, das nach 35 Tagen bei 210 ppb lag. Danach nahm der DON-Gehalt wieder ab.

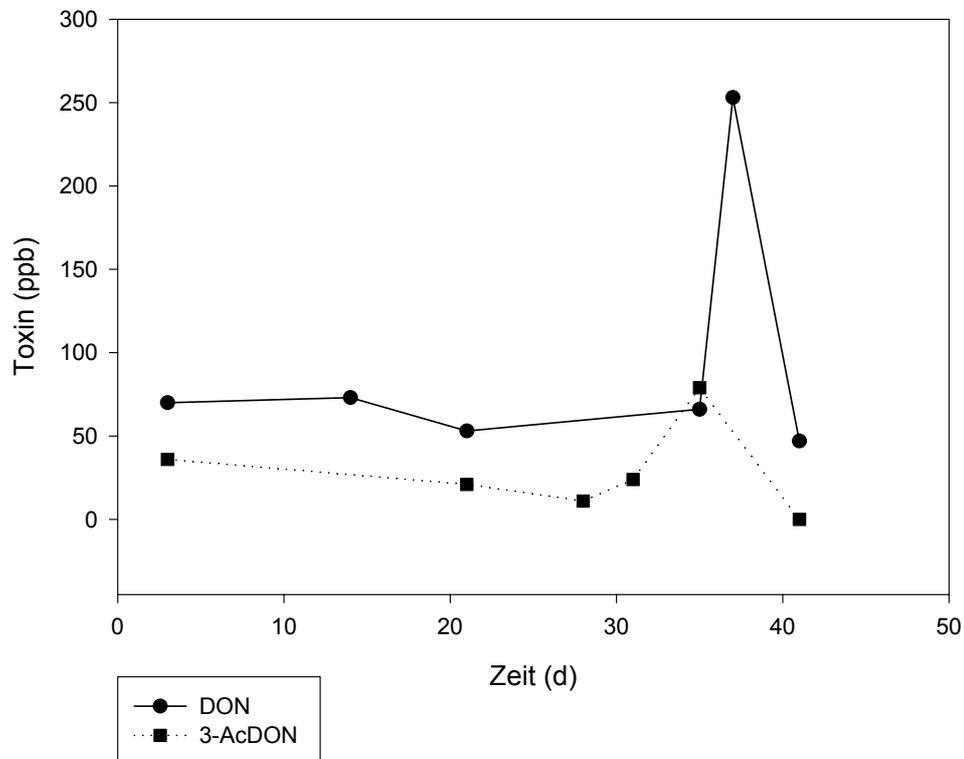
F.graminearum TMW 4.0122

Abbildung 20: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* TMW 4.0122. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Schon nach 4 Tagen der Kultivierung von *F. graminearum* TMW 4.0122 konnten DON (70 ppb) und 3-AcDON (36 ppb) detektiert werden. Bei 3-AcDON blieb dieses Level bis zum 34. Tag erhalten. Gleichzeitig stieg der DON-Gehalt auf 253 ppb an.

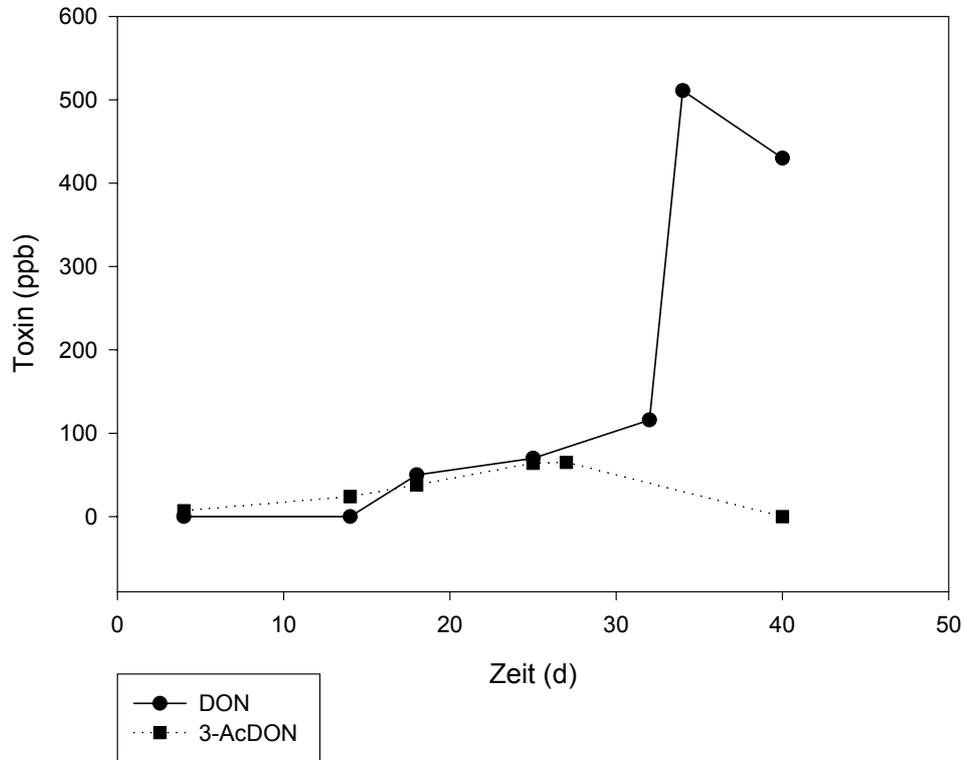
F.graminearum TMW 4.0185

Abbildung 21: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* TMW 4.0185. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Zwischen 7 – 65 ppb 3-AcDON wurden im Zeitraum zwischen 4 und 28 Tagen gebildet, dann stoppte die Bildung und es wurde vermehrt DON gebildet, das nach 34 Tagen auf 511 ppb anstieg.

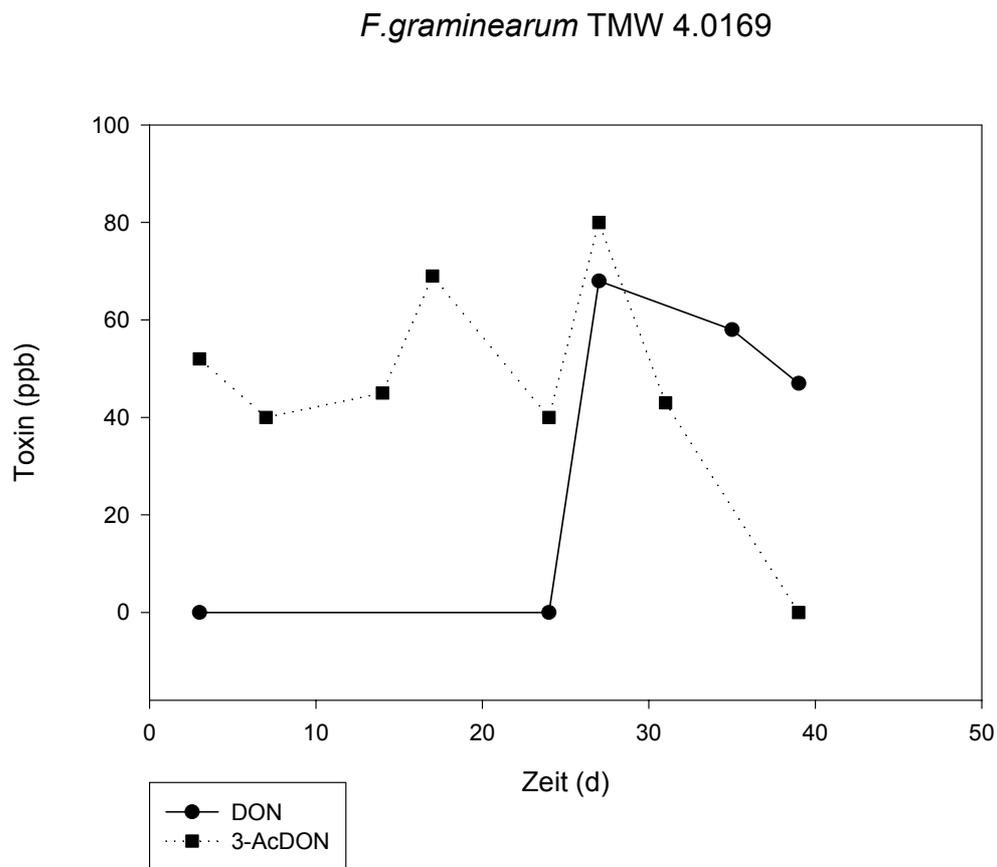


Abbildung 22: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* TMW 4.0169. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Von Stamm *F. graminearum* TMW 4.0169 wurden 27 – 68 ppb 3-AcDON gebildet. Nach 30 Tagen stoppte diese Bildung. DON wurde nach 27 Tagen gebildet, jedoch nur 68 ppb. Danach wurden nur noch geringe Mengen nachgewiesen.

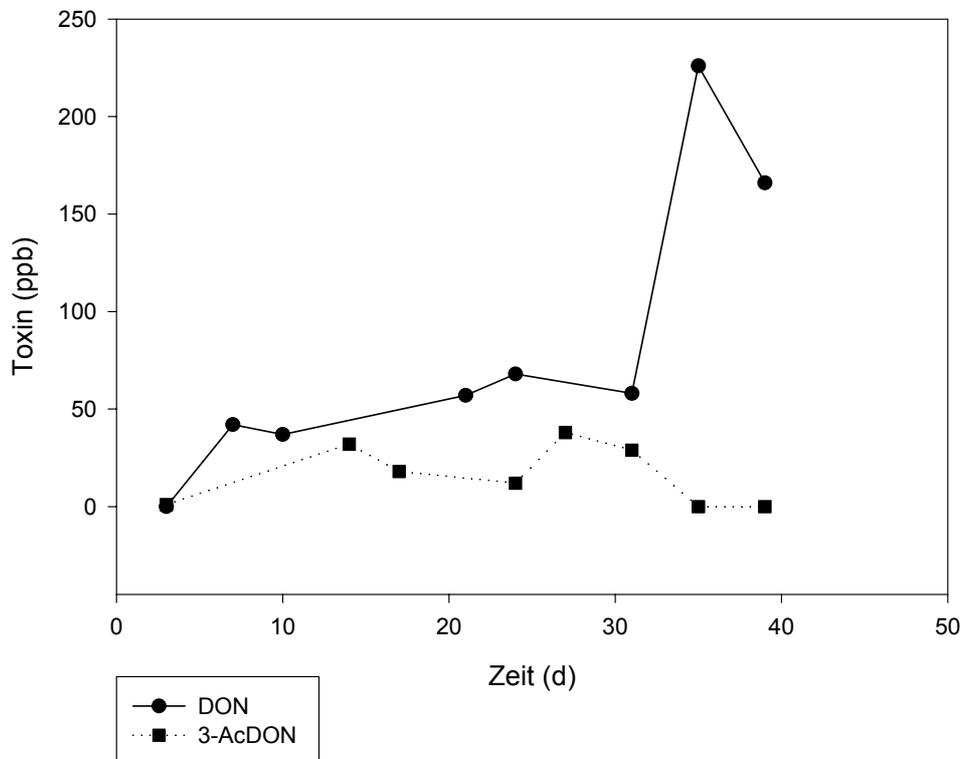
F.graminearum TMW 4.0177

Abbildung 23: Verlauf der Toxinbildung von *F. graminearum* TMW 4.0177. Die Inkubation erfolgte bei 2,5 g/l Glucose und 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Sowohl 3-AcDON als auch DON wurden bei *F. graminearum* 4.0177 schon sehr früh gebildet. 3-AcDON schwankte um den Wert von 30 ppb. Die Bildung kam nach 31 Tagen zum Erliegen. DON wurde zunächst mit Werten zwischen 40 und 70 ppb gebildet. Nach 30 Tagen stieg es stark an und hatte einen Maximalwert von 226 ppb nach 35 Tagen.

3.9.3. Quantifizierung von mRNA im LightCycler™

3.9.3.1. Auswahl geeigneter PCR-Reaktionen

Die aus Pilzmyzel extrahierte RNA wurde nach der DNase-Behandlung zunächst mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Um festzustellen, ob ausreichend RNA in guter Qualität vorhanden ist, wurde eine PCR mit β -Tubulin-Primern (Bt2) durchgeführt. Das entsprechende Gen wird konstitutiv exprimiert und eignet sich daher als Kontrollgen.

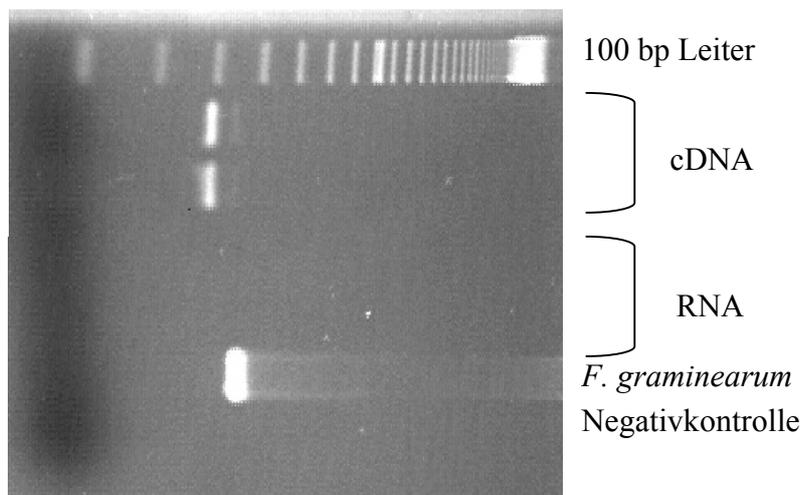


Abbildung 24: Agarosegel mit Produkten einer Bt2-PCR, in die zum einen RT-Produkte (Spur 1 und 2) als auch die entsprechende RNA ohne RT-Reaktion (Spur 3 und 4) eingesetzt wurde. Positivkontrolle war DNA aus *F. graminearum* DSM 4527. Negativkontrolle war DNA- und RNAfreies Wasser.

In Abbildung 24 ist das Ergebnis einer Bt2-PCR zu sehen, in die jeweils zwei RNA-Proben eingesetzt wurden. Die ersten beiden Banden stammten aus Ansätzen mit den jeweiligen RT-Produkten. Deutlich sind zwei Banden zu erkennen. Diese Banden traten erwartungsgemäss nicht auf, wenn nur RNA ohne vorhergehende RT-Reaktion eingesetzt wurde (Spur 3 und 4). Als Positivkontrolle der PCR diente DNA aus *F. graminearum*. Hier konnte aufgrund eines Introns ein grösseres Fragment als mit den RT-Produkten detektiert werden. Eine Unterscheidung zwischen cDNA und DNA war so möglich und Verunreinigungen mit DNA konnten somit überprüft werden.

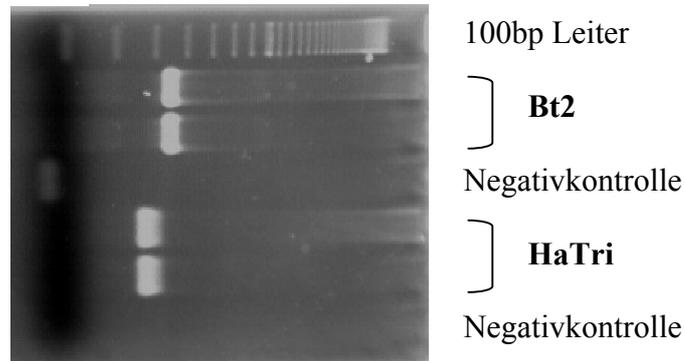


Abbildung 25: Agarosegel mit PCR-Produkten einer Bt2-PCR (Spuren 1-3) und einer HaTri-PCR (Spuren 4-6). Als Negativkontrolle diente jeweils DNA- und RNAfreies Wasser.

Zur Untersuchung der Expression des Tri5-Gens wurde ein geeignetes Primer-Paar ausgewählt. Die HaTri-Primer ergeben ein 260 bp grosses Fragment (Edwards 2001). In Abbildung 25 ist der Vergleich zwischen Fragmenten einer Bt2-PCR und einer HaTri-PCR gezeigt. Jeweils zwei RT-Produkte wurden eingesetzt. Deutliche Banden waren zu erkennen.

3.9.3.2. Analyse der Schmelzkurven im LightCycler™

Die Identifizierung der PCR-Produkte im Agarosegel diente nur zu Beginn der Versuche zur Überprüfung und Bestätigung der Resultate. Danach erfolgte die Identifizierung anhand von Schmelzkurven der PCR-Produkte. Diese wurden anschliessend an die PCR in einem zusätzlichen Programmschritt im LightCycler™ aufgenommen. Jedes Fragment wird durch seine typische Schmelzkurve gekennzeichnet.

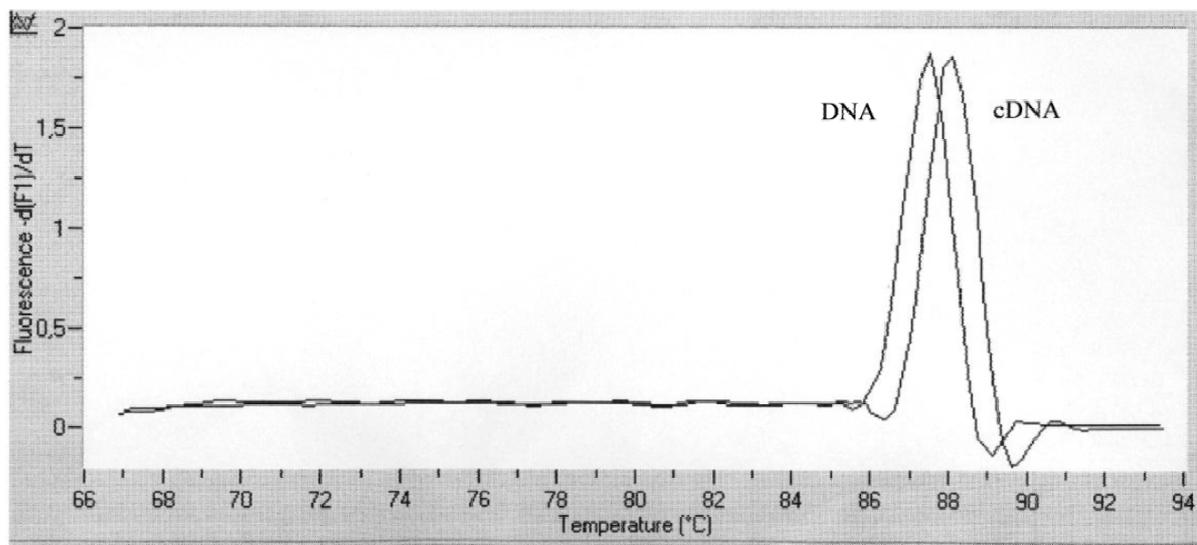


Abbildung 26: Schmelzkurven zweier Bt2- PCR-Produkte mit dem LightCycler™ analysiert. Die erste Kurve zeigt ein PCR-Produkt aus DNA, die zweite aus dem RT-Produkt einer RNA (= cDNA). Die Schmelzkurve wurde von der LightCycler-Software berechnet. Die Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit ist gegen die Temperatur aufgetragen

Die Schmelzkurven der Bt2-PCR-Produkte sind in Abbildung 26 zu sehen. Parallel zu den Banden im Agarosegel sind auch hier die Schmelzkurven des Produktes der cDNA von denjenigen der DNA zu unterscheiden. Das PCR-Produkt der DNA hat eine Schmelztemperatur von 87,4 $^{\circ}\text{C}$, das Produkt der cDNA von 88 $^{\circ}\text{C}$.

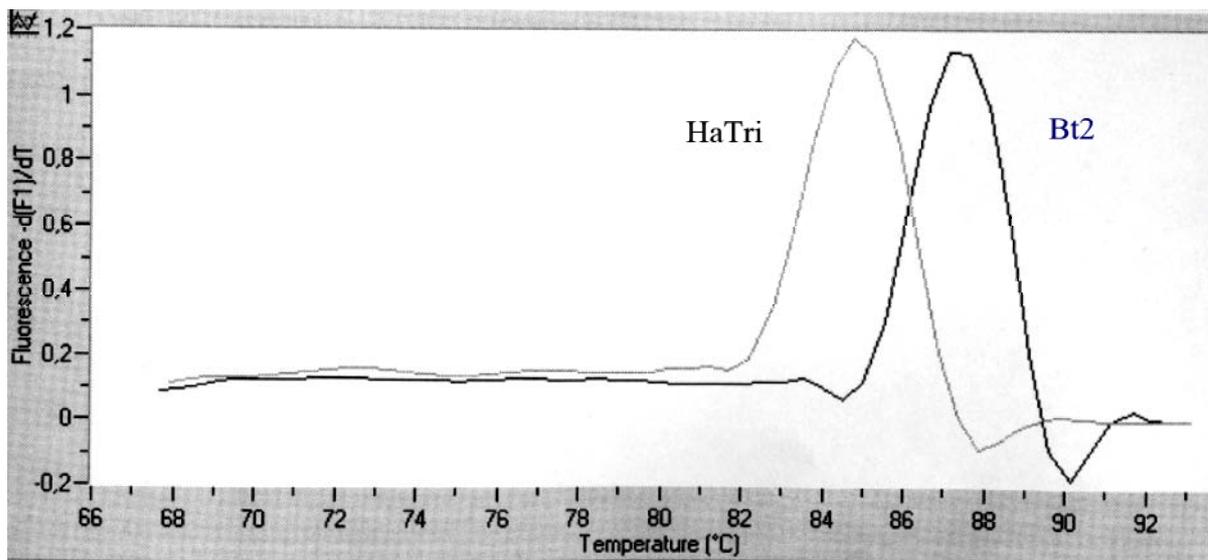


Abbildung 27: Schmelzkurve eines PCR-Produktes einer HaTri-PCR im Vergleich mit Schmelzkurve eines PCR-Produktes einer Bt2-PCR. Die Schmelzkurve wurde von der LightCycler-Software berechnet. Die Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit ist gegen die Temperatur aufgetragen

Ein Vergleich der Schmelzkurven der PCR-Produkte der HaTri- und Bta-2-PCR-Programme sind in Abbildung 27 dargestellt. Das HaTri-Produkt hat eine Schmelztemperatur von 84,8 °C.

3.9.3.3. Kalibrationskurve zur Quantifizierung von DNA

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden Kalibrationskurven aus DNA-Verdünnungsreihen von *F. graminearum* TMW 4.0122 bzw. *F. culmorum* TMW 4.0754 erstellt. Aus den Eichgeraden wurden die DNA-Mengen der unbekanntenen Proben bestimmt. In Abbildung 28 ist beispielhaft eine Kalibration mit DNA von *F. graminearum* TMW 4.0122 dargestellt.

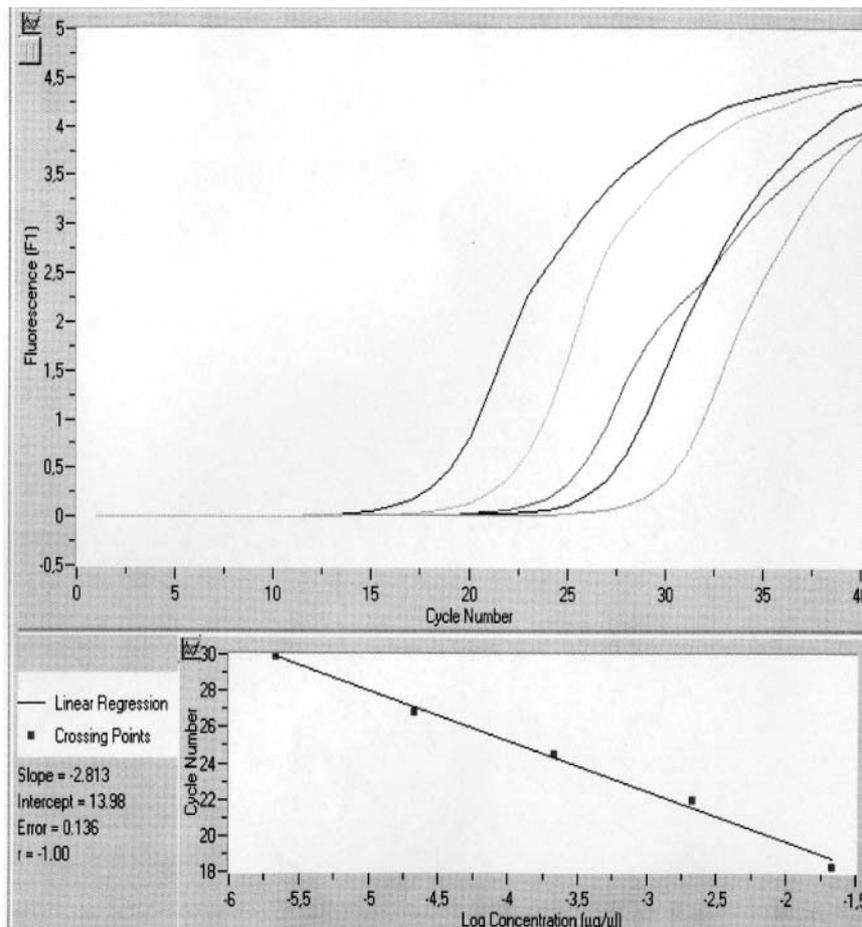


Abbildung 28: Kalibrationskurve und Regressionsgerade einer Bt2-PCR mit einer DNA-Verdünnungsreihe von *F. graminearum* TMW 4.0122. Die Regression wurde von der LightCycler-Software berechnet. Der Logarithmus der Konzentration wurde gegen die Zyklenzahl aufgetragen.

In der oberen Abbildung 28 sind die Fluoreszenzkurven der verschiedenen Verdünnungen in Abhängigkeit der PCR-Zyklen aufgetragen. Darunter ist die daraus berechnete lineare Regression dargestellt. Es wurde die Zyklenzahl gegen die DNA-Konzentration logarithmisch aufgetragen. Aus dieser Regression konnten unbekanntene DNA-Mengen kalkuliert werden.

3.9.4. Vergleich Mykotoxinbildung und Expression des Tri5-Gens

Die Stämme *F. graminearum* TMW 4.0122 und *F.culmorum* TMW 4.0754 wurden bei unterschiedlichen Temperaturen und Glucosekonzentrationen im Medium auf Mykotoxinbildung und Genexpression untersucht.

In den in diesem Kapitel aufgeführten Abbildungen sind jeweils die Toxingehalte von DON und 3-AcDON gegen die Zeit aufgetragen. Darüber hinaus ist die Expression des Tri5-Gens dargestellt. Die Bestimmung erfolgte anhand der Quantifizierung der PCR-Produkte einer HaTri-PCR, in die cDNA der jeweiligen Proben als Template eingesetzt wurde. Diese wurde prozentual im Vergleich zur Expression des β -Tubulin-Gens berechnet. Das konstitutiv exprimierte β -Tubulin-Gen wurde Kontrollgen eingesetzt. Seine Expression konnte in allen untersuchten Proben bestimmt werden und verlief sehr gleichmässig.

3.9.4.1. Untersuchungen mit *F. graminearum* TMW 4.0122

Der Stamm *F. graminearum* TMW 4.0122 wurde bei zwei unterschiedlichen Temperaturen auf Mykotoxinbildung und Genexpression getestet. Die Glucosekonzentration war mit 2,5 g/l bei den Versuchen jeweils identisch.

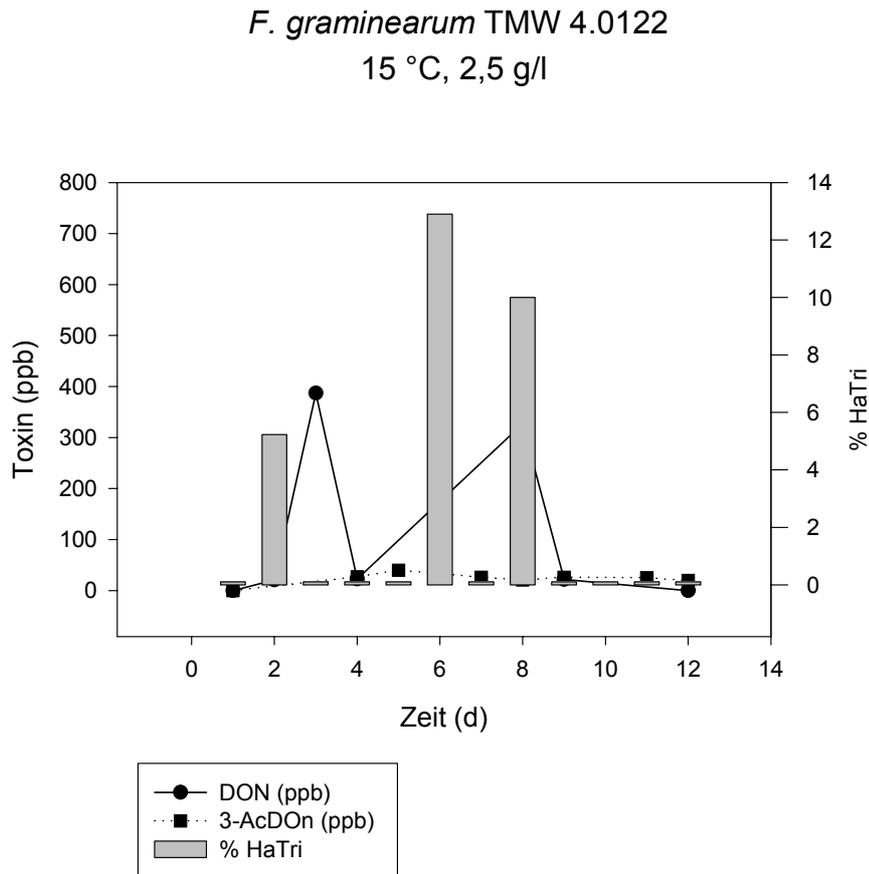


Abbildung 29: Toxinbildung und Genexpression bei *F. graminearum* TMW 4.0122 bei 15 °C und 2,5 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen. Die Expression des Tri5-Gens wurde mit der PCR quantifiziert und prozentual im Vergleich zur Expression des β -Tubulin-Gens angegeben (% HaTri).

Bei einer Inkubationstemperatur von 15 °C wurde nach drei Tagen 387 ppb DON gemessen. Dieser Wert nahm danach wieder ab. Erst nach 8 Tagen konnten wiederum 327 ppb DON nachgewiesen werden. Das Toxin 3-AcDON konnte nur in Spuren (ca. 20 ppb) detektiert werden. Eine Expression des Tri5-Gens konnte nach 2 Tagen mit 5 % gesehen werden. Nach 6 bzw. 8 Tagen konnte jeweils ein Wert von 13 bzw. 10 % HaTri-Produkt detektiert werden.

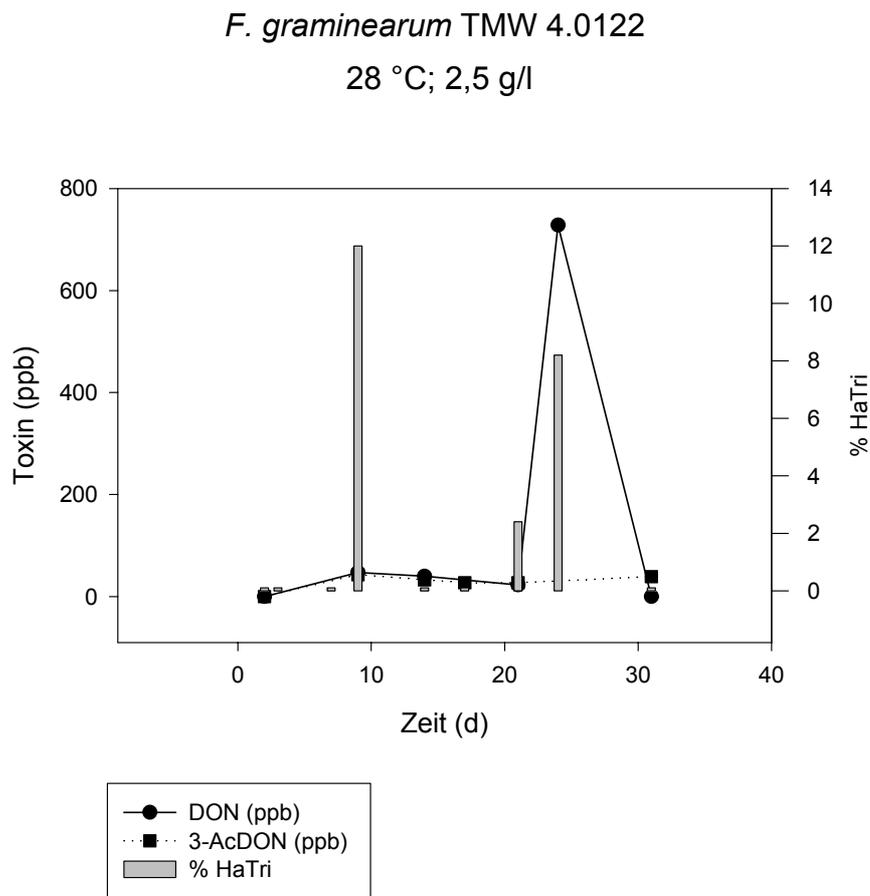


Abbildung 30: Toxinbildung und Genexpression bei *F. graminearum* TMW 4.0122 bei 28 °C und 2,5 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen. Die Expression des Tri5-Gens wurde mit der PCR quantifiziert und prozentual im Vergleich mit der Expression des β -Tubulin-Gens angegeben (% HaTri).

Die Versuchsdurchführung bei 28 °C resultierte in einem DON-Wert von 728 ppb nach 24 Tagen. Zuvor konnte DON nur in Spuren nachgewiesen werden. 3-AcDON wurde mit Werten zwischen 27 und 43 ppb bestimmt. Die Expression des Tri5-Gens war am höchsten nach 9 Tagen mit 12 %. Danach konnten nach 21 und 24 Tagen noch einmal eine Expression beobachtet werden, die jedoch geringer war.

3.9.4.2. Untersuchungen mit *F. culmorum* TMW 4.0754

Der Stamm *F. culmorum* TMW 4.0754 wurde bei zwei unterschiedlichen Temperaturen und bei zwei verschiedenen Glucosekonzentrationen des Mediums untersucht.

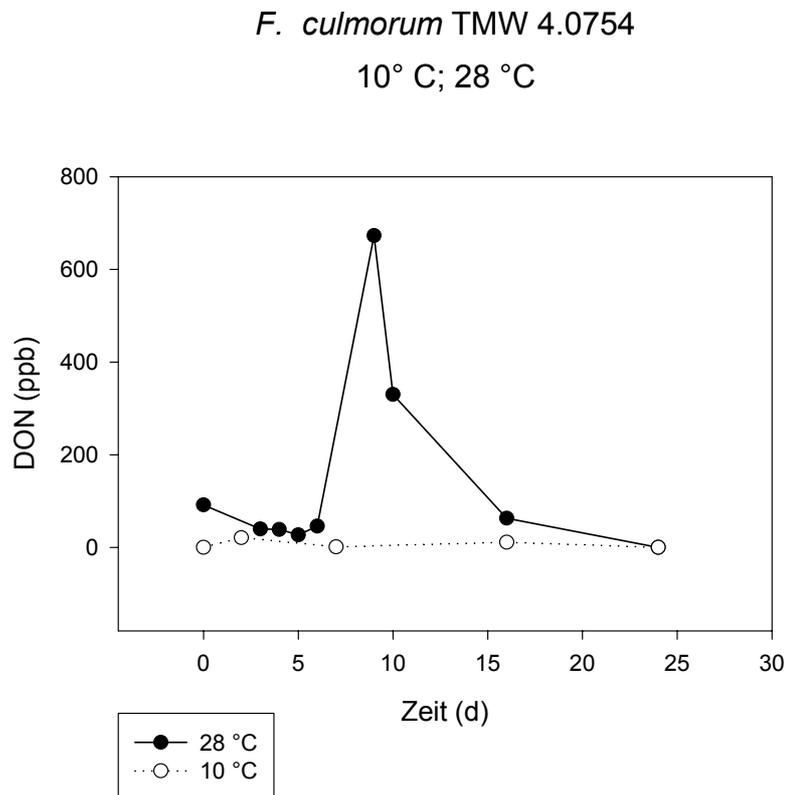


Abbildung 31: Toxinbildung und Genexpression bei *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 10 °C und 28 °C und 2,5 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

In Abbildung 31 wird ein Vergleich der gemessenen DON-Mengen bei Versuchstemperaturen von 10 °C bzw. 28 °C dargestellt. Nur bei einer Inkubation bei 28 °C wurden erhöhte DON-Konzentrationen detektiert. Bei 10 °C waren die Werte sehr gering. Im Folgenden werden die Ergebnisse ausführlich erläutert.

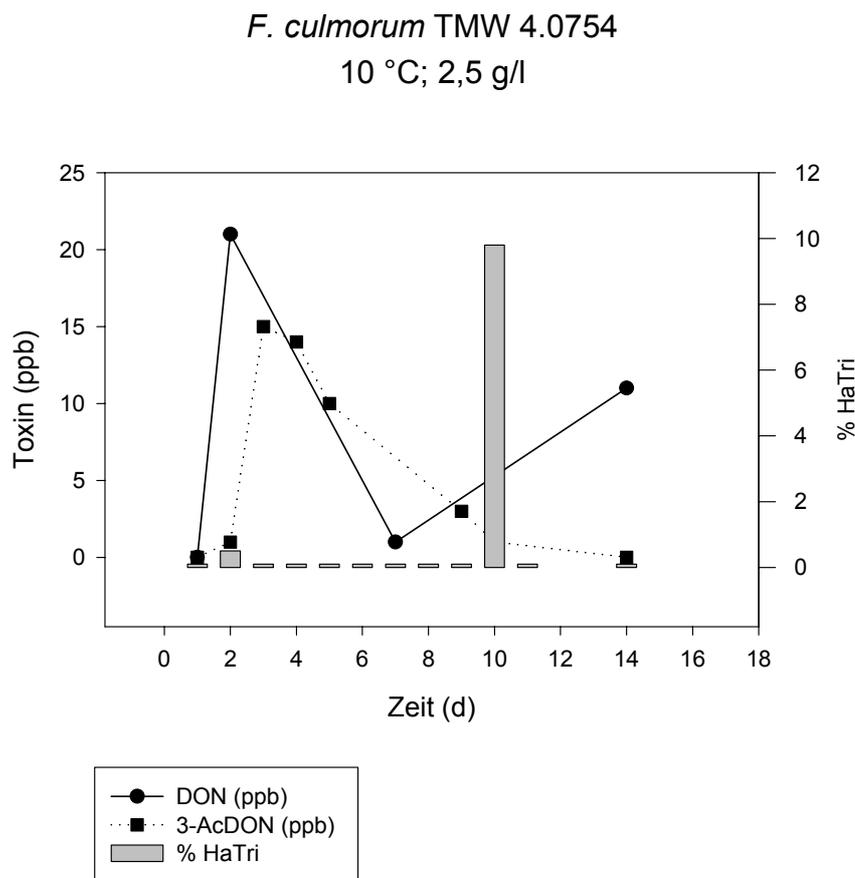


Abbildung 32: Toxinbildung und Genexpression bei *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 10 °C und 2,5 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen. Die Expression des Tri5-Gens wurde mit der PCR quantifiziert und prozentual im Vergleich zur Expression des β -Tubulin-Gens angegeben (% HaTri).

Bei einer Temperatur von 10 °C und 2,5 g/l Glucose wurden nur geringe Toxinmengen produziert. Bei DON lagen die Werte zwischen 1 und 21 ppb, bei 3-AcDON zwischen 1 und 15 ppb. Beide Toxine stiegen zunächst an, um dann abzunehmen. Erst nach 14 Tagen erhöhte sich der DON-Wert wieder. Eine Tri5-Expression wurde nach 10 Tagen beobachtet. Sie machte 10 % der β -Tubulin-Expression aus.

F. culmorum TMW 4.0754
28 °C, 2,5 g/l Glucose

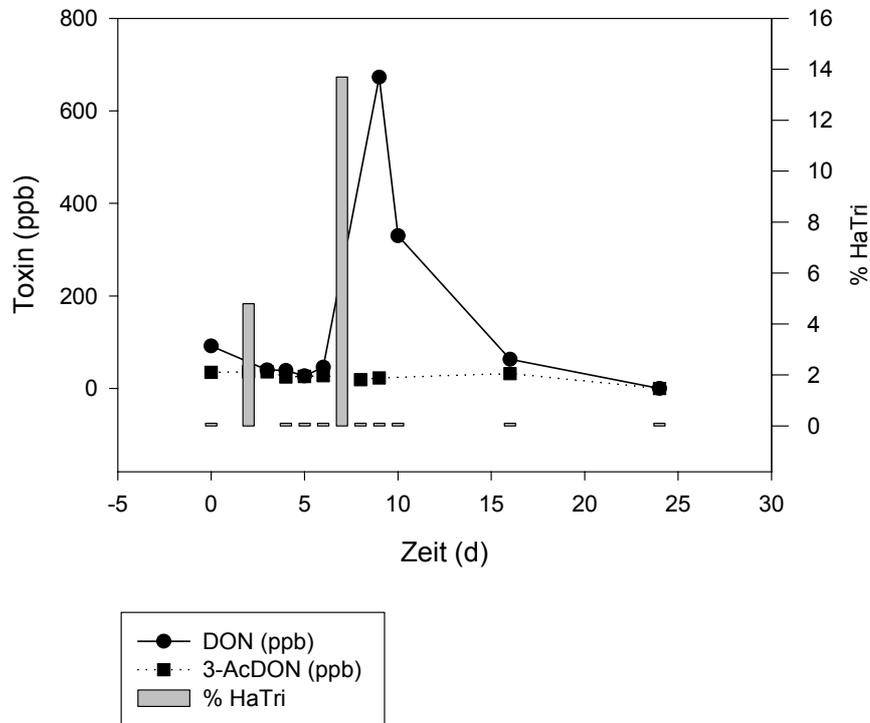


Abbildung 33: Toxinbildung und Genexpression bei *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 28 °C und 2,5 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen. Die Expression des Tri5-Gens wurde mit der PCR quantifiziert und prozentual im Vergleich mit der Expression des β -Tubulin-Gens angegeben (% HaTri).

Die Inkubation von *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 28 °C resultierte in deutlich höheren Toxingehalten. Nach 9 Tagen stieg der DON-Gehalt stark auf 673 ppb an. Die Abnahme erfolgte in den darauffolgenden Tagen. Das Toxin 3-AcDON konnte nur in geringen Mengen zwischen 19 und 36 ppb nachgewiesen werden. Die erste Expression des Tri5-Gens konnte nach 2 Tagen mit 5 % beobachtet werden. Nach 7 Tagen lag sie bei rund 14 %.

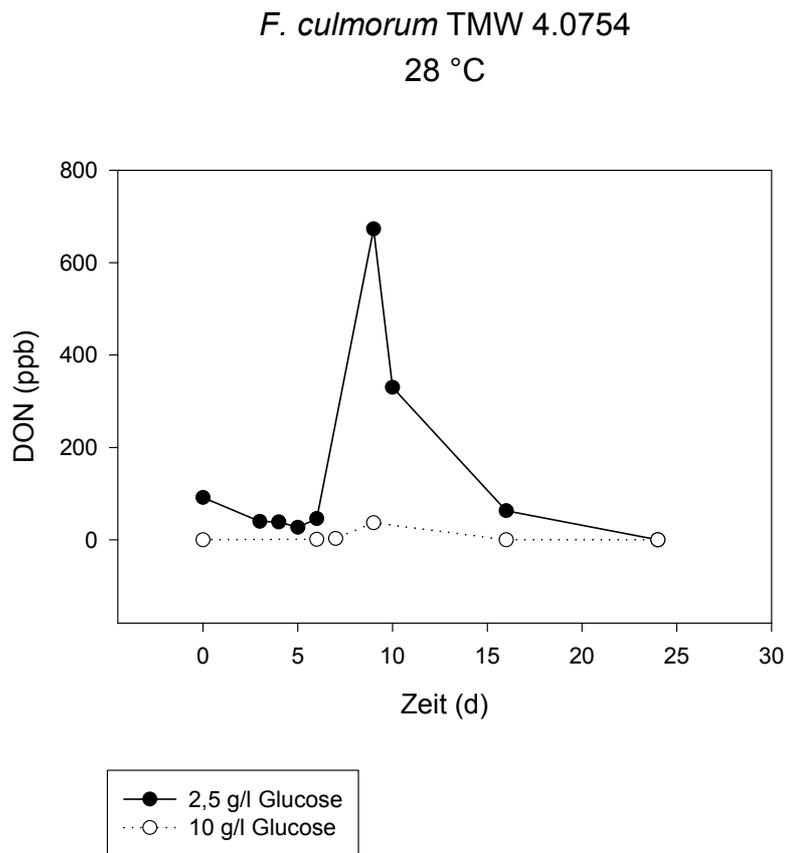


Abbildung 34: Toxinbildung und Genexpression bei *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 10g/l und 2,5 g/l Glucose. Die Temperatur betrug 28 °C. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen.

Die in Abbildung 34 gezeigten Ergebnisse ergaben sich aus einer Untersuchung, bei der die Temperatur bei 28 °C konstant gehalten wurde, die Glucosekonzentration jedoch zwischen 2,5 g/l und 10 g/l variierte. Während bei einem Glucosegehalt von 2,5 g/l deutliche DON-Mengen gebildet wurden, waren diese bei dem Ansatz mit 10 g/l Glucose gering.

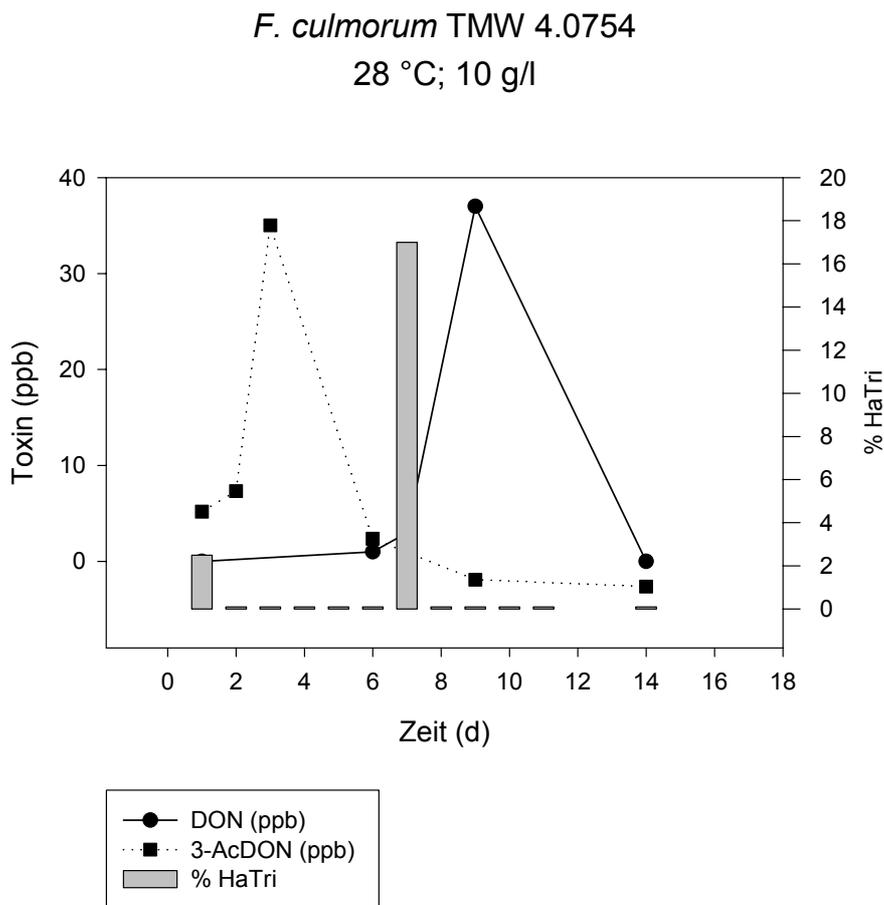


Abbildung 35: Toxinbildung und Genexpression bei *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 28 °C und 10 g/l Glucose. Die Toxine DON und 3-AcDON wurden gemessen. Die Expression des Tri5-Gens wurde mit der PCR quantifiziert und prozentual im Vergleich mit der Expression des β -Tubulin-Gens angegeben (% HaTri).

Es sind die detaillierten Ergebnisse eines Versuches bei 28 °C und 10 g/l Glucose dargestellt. DON stieg langsam an und wurde erst nach 9 Tagen mit einem Wert von 37 ppb detektiert. Die Bildung von 3-AcDON hatte ein Maximum von 53 ppb nach 3 Tagen. Die Expression des Tri5-Gens war schon am ersten Tag mit 2,5 % zu sehen. Am 7. Tag war eine deutliche Expression von 17 % zu detektieren.

4. Diskussion

4.1. Extraktionsverfahren für *Fusarium*-DNA aus Getreide und Malz

4.1.1. Optimierung des Verfahrens

Neben den herkömmlichen mikrobiologischen (Nirenberg 1981, Böhm-Schraml 1993 *et al.*) und immunologischen Methoden (Banks *et al.* 1996) zur Detektion von *Fusarium*-Arten, wurden in den letzten Jahren verstärkt Verfahren, die auf der PCR-Technologie (Saiki *et al.* 1988) basieren, eingesetzt. Die Kenntnis von Gensequenzen, die bei der Pathogenität, Virulenz und Toxizität von *Fusarium*-Arten eine Rolle spielen, wurden für die Entwicklung von entsprechenden PCR-Protokollen genutzt. Der Nachweis von *F. graminearum* (Niessen und Vogel 1997), *F. culmorum* (Schilling *et al.* 1996) und der Gruppe der Trichothecenbildner (Niessen und Vogel 1998) kann über eine PCR-Methode geführt werden. Für die Entwicklung, Optimierung und Anwendung einer PCR-Methode ist die Qualität der eingesetzten DNA von grosser Bedeutung.

Aus der grossen Anzahl der möglichen DNA-Extraktionsmethoden muss für eine spezielle Anwendung jeweils die geeignete ausgesucht und optimiert werden. Der erste entscheidende Schritt ist der Zellaufschluss. Dieser kann durch Mörsern in flüssigen Stickstoff, Mahlen mit Glasperlen, abwechselndes Einfrieren-Auftauen oder Ultraschall durchgeführt werden (Haughland *et al.* 1999, van Burik *et al.* 1998). Für die Extraktion von *Fusarium*-DNA aus Getreide und Malz wurde eine Methode entwickelt, die für den Zellaufschluss bzw. das Lösen der DNA aus dem Getreide eine Ultraschallsonde verwendet. Die Ultraschallmethode ist einfach anzuwenden, schnell und liefert effiziente Resultate (Heller *et al.* 1992). Die Verwendung von Ultraschall zum Aufschluss von Bakteriensporen wurde von Belgrader *et al.* (1999) untersucht. Die Durchführung der Methode benötigte nur 30 Sekunden und die Qualität der DNA war für eine PCR ausreichend.

Auch in der vorliegenden Arbeit bewährte sich die Verwendung der Ultraschallmethode. Vor allem die Möglichkeit zur schnellen Durchführung und der einfachen Anwendbarkeit standen im Vordergrund. Der Aufschluss konnte in einer Minute durchgeführt werden, was einer Anwendung in der Routineanalytik zu Gute kommt.

Nach der Ultraschallbehandlung muss die DNA aus dem Lysat extrahiert werden. Eine Möglichkeit ist die Extraktion mit Phenol-Chloroform, die zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren führt. Die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase können anschließend mit Alkohol gefällt werden (Raeder und Broda 1985). Diese Art der Extraktion ist zeitaufwändig

und die verwendeten Chemikalien sind toxisch (Löffler *et al.* 1997). Als Alternative hierzu können kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits verwendet werden. Diese beruhen auf der Bindungsaffinität der DNA an Festphasen, die Hydroxylgruppen besitzen, wie z.B. Silikagel oder Celite. Der Vorteil dieser Kitsysteme ist die sehr einfache, handliche und schnelle Durchführung der Extraktion mit der Möglichkeit zur weitgehender Standardisierung. Bei dem in dieser Arbeit eingesetztem Kit der Firma Roche Molecular Biochemical (Mannheim) wird die DNA an ein Glasfaser-Vlies gebunden. Danach werden durch verschiedenen Waschschrirte mit speziellen Puffern Verunreinigungen bzw. Störsbstanzten entfernt. Die zum Schluss eluierte DNA ist von hoher Reinheit und Qualität und kann problemlos in eine PCR eingesetzt werden.

Viele Matrizes, aus denen DNA extrahiert wird, enthalten Substanzen, die inhibierend auf die DNA-Extraktion oder Folgereaktionen wirken können. Eine Hemmung kann an verschiedenen Stellen stattfinden. Die Zell-Lyse, die zur DNA-Extraktion nötig ist, kann gestört werden oder die DNA kann abgebaut oder für weitere Untersuchungen blockiert werden. Darüber hinaus kann die Amplifikation der DNA bei einer PCR nach der Extraktion gehemmt werden. In den verschiedenen Untersuchungsmaterialien können unterschiedlichste inhibierende Komponenten enthalten sein. In Lebensmitteln sind häufig organische und phenolische Substanzen zu finden. In Umweltproben kommen neben phenolischen Substanzen Huminsäuren und Schwermetalle vor (Wilson 1997). Aus Pflanzen können Polysaccharide, Polyphenole und andere Sekundärmetabolite bei einer Extraktion isoliert werden, die molekularbiologische Untersuchungen stören könnten (Koonjul *et al.* 1999, John 1992). Da dieses Problem auch bei Getreide- und Malzproben auftreten kann, wurde nach Stoffen gesucht, die diese Störsbstanzten binden können.

Aus dem Wissen, dass Polyphenole durch Polyvinylpyrrolidon (PVP) gebunden werden können (John 1992, Su und Gibor 1988), wurde von verschiedenen Autoren der Einsatz von PVP untersucht. Zum einen wurde PVP direkt in PCR-Ansätzen eingesetzt (Koonjul *et al.* 1999), zum anderen wurde PVP als Extraktionspufferzusatz verwendet (Bourrain *et al.* 1999). Beide Möglichkeiten führten zu positiven Ergebnissen und kehrten die inhibierende Wirkung der Polyphenole um.

Da eine PCR-Reaktion sehr empfindlich ist und jede zusätzliche Störung vermieden werden sollte, wurde der Einsatz von PVP zur Extraktion von *Fusarium*-DNA aus Getreide nicht in der PCR sondern als Zusatz zur Extraktion getestet. Eine Zugabe von 6 % PVP in den Lysepuffer vor der Ultraschallbehandlung führte zu einer Verbesserung der Extraktionseffizienz und der DNA-Qualität. Ein Waschen der Extraktionssäulen des Kits mit

einer PVP-Lösung zeigte hingegen keine Verbesserung des Extraktionsergebnisses. Die bei der Extraktion herausgelösten Polyphenole müssen wahrscheinlich möglichst schnell gebunden werden, damit sie nicht selbst an die DNA binden und diese blockieren. Aus diesem Grund ist der Einsatz von PVP direkt im Lysepuffer sinnvoll.

Die Untersuchungen ergaben, dass vor allem bei Malzproben die Verwendung von PVP notwendig ist, um sinnvolle Ergebnisse zu erhalten. In einem Protokoll ohne PVP wurde aus Malzproben qualitativ schlechte oder zuwenig DNA extrahiert, so dass kein Signal in der PCR zu sehen war. Nur bei einem Einsatz von PVP konnten klare und reproduzierbare Resultate erzielt werden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass Malze im Gegensatz zum reinen Getreide durch den Mälzungsprozess ein verändertes Substanzspektrum haben und eine grössere Menge an Inhibitoren besitzen bzw. freisetzen. Eventuell werden Polyphenole bei der Mälzung gebildet.

4.1.2. Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens

Um eine vollständige Aussage über die Kontamination von Getreide mit *Fusarium*-Arten treffen zu können, müssen reproduzierbare Methoden verwendet werden. Zunächst muss dafür gesorgt werden, dass der komplette Befall der Probe untersucht werden kann. Aus diesem Grund wurden die Proben vor der DNA-Extraktion gemahlen und somit eine gleichmässige Verteilung und Vermischung erreicht.

Die Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktionsmethode wurde zunächst nur qualitativ dadurch untersucht, dass mehrere Aliquots von Getreideproben unabhängig voneinander extrahiert wurden. Der Vergleich der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel. Diese Versuche zeigten eine gute Übereinstimmung der jeweiligen Ergebnisse. Die Signale waren bei unterschiedlichen Extraktionen einer Probe visuell identisch.

Um die Reproduzierbarkeit quantitativ zu überprüfen, wurden beispielhaft aus zwei Weizenproben jeweils verschiedene Extraktionen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine Standardabweichung von 14 % bzw. 18 % zwischen den einzelnen Extraktionen. Betrachtet man die Tatsache, dass bei der Methode mehrere Fehlerquellen auftreten können, da einige Arbeitsschritte durchzuführen sind, ist dieses Ergebnis sehr gut und kann für die Untersuchung von Getreide akzeptiert werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn PCR als Screeningmethode eingesetzt wird.

4.1.3. Anwendung des Extraktionsverfahrens an Getreideproben

Das optimierte DNA-Extraktionsverfahren für *Fusarium*-Arten aus Getreide und Malz eignet sich sehr gut für eine schnelle, einfach durchzuführende und verlässliche Analyse des Befallsstatus. In maximal fünf Minuten kann die DNA einer Probe extrahiert werden. Dies ist für ein schnelles Screening von Getreide oder Malz in der industriellen Anwendung von grossem Vorteil. Darüber hinaus ist die Verwendung des kommerziell erhältlichen Extraktionskits selbst für unerfahrene Anwender sehr einfach und gesundheitsschädliche Reagenzien wie Phenol werden vermieden. Die extrahierte DNA ist von guter Qualität und kann für molekularbiologische Applikationen verwendet werden.

Die beschriebene Extraktionsmethode wurde an rund 600 Getreideproben angewandt und führte zu gut auswertbaren Ergebnissen. Das Probenspektrum umfasste unterschiedlichste Bereiche. Es wurden sowohl natürlich als auch künstlich kontaminierte Proben unterschiedlichster Herkunft mit Erfolg untersucht. Auch Malzproben, die ein sehr schwieriges Material darstellen, konnten mit dieser Methode untersucht werden.

Der Einsatz der Methode ist nicht beschränkt auf die Untersuchung von *Fusarium*-Kontaminationen auf Getreide, sondern kann auch benutzt werden zur Detektion von *Alternaria alternata* in Tomatenprodukten oder *Zygosaccharomyces rouxii* in Honig and Marzipan (nicht veröffentlichte Daten).

4.2. Probenahme aus Getreide für die PCR-Analytik

Zur Beurteilung der Kontamination von Getreide mit *Fusarium*-Arten aus grossen Probenmengen, die im Maßstab eines industriellen Screenings liegen, muss abgeschätzt werden, wie hoch die Variabilität zwischen den einzelnen Stichproben ist. Eine ungeeignete Art der Probenahme kann zu einer falschen Einstufung des Materials unabhängig von der Qualität der darauf folgenden Analyse führen.

Der Probenahmefehler trägt meist den grössten Anteil zum Gesamtfehler bei. Der Fehler kann minimiert werden durch Erhöhung der Probenmenge und Probenanzahl. Darüber hinaus sollte für eine gute Durchmischung der Probe gesorgt werden (Sampling for Mycotoxin Analysis - EP/7101-92-02 - Joint FAO/UNEP Project 1990). Die Durchmischung einer Getreideprobe kann durch Mahlen verbessert werden, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Für eine umfassende Untersuchung des Einflusses der Probenahme auf die PCR-Analytik im industriellen Maßstab standen nicht die geeigneten Proben und Probenmengen zur Verfügung.

Aus diesem Grund wurden Versuche an einem Modell durchgeführt. Hierfür dienten 50 kg mit *F. culmorum* infizierte Gerste. Hieraus wurden mehrfach Proben gestochen und daraus die DNA extrahiert. Die Untersuchung der DNA erfolgte anhand einer quantitativen PCR und die DNA-Mengen der verschiedenen Proben konnten miteinander verglichen werden. Die Schwankungen, die an den Standardabweichungen der Mittelwerte abgelesen werden konnten, reichten von 3-20 %. Fasst man die Ergebnisse zusammen, ergab sich eine Variation von 17 %. Da die Kontamination von Getreide nicht gleichmässig über die gesamte zu untersuchende Menge verteilt ist, sondern oft in sogenannten 'hot spots', also punktuell vorkommt, war eine solche Abweichung zu erwarten. In Versuchen zur Probenahme von Weizen, der auf DON getestet wurde, werden von Whitaker *et al.* (2000) ebenfalls Standardabweichung angegeben. Die Autoren unterscheiden zwischen den einzelnen Schritten der Bearbeitung. Für die Probenahme aus Getreide wird eine Varianz von 6,3 % angegeben. Für das Mahlen der einzelnen Probe und das Aufteilen in Aliquots, die untersucht werden, ist eine Abweichung von 10 % zu sehen. Diese Ergebnisse liegen in einem ähnlichen Bereich mit denjenigen des in dieser Arbeit verwendeten Modells.

Idealerweise sollte die Probemenge und die Probenanzahl möglichst gross sein. Da dies jedoch sehr oft praktikable Grenzen hat bzw. zu kostenintensiv sein würde, müssen Kompromisse gemacht werden. In dieser Arbeit wurden die vorhandenen Probenmengen zur guten Durchmischung gemahlen und in eine Extraktion wurden 20 g Material eingesetzt. Bei der Auswertung der Resultate der molekularbiologischen Untersuchungen von Getreideproben sollte allerdings immer beachtet werden, dass eine Fehlerquelle immer auch die Probennahme darstellt.

4.3. Schnelle Verfahren zur DNA-gestützten Detektion von *Fusarium*-Arten

4.3.1. Entwicklung einer Triplex-PCR

Für die Bestimmung von *Fusarium*-Arten auf DNA-Ebene stehen inzwischen zahlreiche PCR-Protokolle zur Verfügung (Yoder und Christianson 1997, Jaeger *et al.* 2000, Hue *et al.* 1999, Nicholson *et al.* 1998). Für die in Europa auf Getreide am häufigsten vorkommenden Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* wurden ebenfalls geeignete Primer-Paare zum Einsatz in der PCR gefunden (Schilling *et al.* 1996, Niessen und Vogel 1997). Niessen und Vogel (1998) entwickelten ein PCR-Protokoll zur Detektion der gesamten Gruppe der Trichotheceenbildner, die auf einer Sequenz des Tri5-Gens beruht. Mit Hilfe dieser PCR-

Methoden kann der Nachweis einer Kontamination von Getreide schneller als mit mikrobiologischen Methoden durchgeführt werden. Innerhalb drei bis vier Stunden liegt das Resultat vor.

Zur optimalen Nutzung dieser Zeit, wurde eine Triplex-PCR entwickelt, die den Nachweis von *F. culmorum*, *F. graminearum* und der Gruppe der Trichothecenbildner in einen Ansatz vereinigt. Multiplex-PCR ist inzwischen als eine geeignete Methode zur simultanen Detektion von mehreren Zielsequenzen etabliert. Die Anwendung umfasst unter anderem die Detektion von Pathogenen, forensische Untersuchungen und die Diagnose von genetisch bedingten Krankheiten (Edwards und Gibbs 1994, Tang und Persing 1997). Es können zwei bis mehr als 13 verschiedene Primer-Paare eingesetzt werden. In Kombination mit Real-time-PCR ist sie ein sehr schnelles Verfahren zur gleichzeitigen Detektion von verschiedenen Zielsequenzen (Wittwer *et al.* 2001).

Neben dem Vorteil, mehrere Ergebnisse gleichzeitig zu erhalten, die ansonsten in Einzelreaktionen untersucht werden müssten, gibt es weitere positive Effekte. Der Verbrauch an Reagenzien und der Arbeitsaufwand wird minimiert. Darüber hinaus dienen die verschiedenen Amplifikate als interne Kontrolle für die jeweils anderen. Falsch negative Resultate können daher eher aufgedeckt werden, da eine Amplifikation nur eines Fragmentes beweist, dass die Reaktion nicht insgesamt fehlerhaft war.

Zur Entwicklung einer Multiplex-PCR bedarf es neben der Auswahl der geeigneten Primer einiger Optimierungsschritte. Die verwendeten Primer-Paare GaoA (*F. graminearum*), Opt 18 (*F. culmorum*) und Tox5 (Trichothecenbildner) eigneten sich aufgrund ihrer Fragmentlängen von 898 bp (GaoA), 658 bp (Tox5) und 450 bp (Opt 18) sehr gut zur simultanen Amplifikation und Detektion. Die Optimierung umfasste vor allem das Testen der optimalen Annealing-Temperatur, die Optimierung des Reaktionsmixes und das Angleichen der Primer-Konzentrationen, da diese mit unterschiedlicher Affinität an die DNA binden. Das Ziel, alle drei Fragmente mit der gleichen Sensitivität und Spezifität amplifizieren zu können, konnte somit erreicht werden.

4.3.1.1. Sensitivität der Triplex-PCR

Die Sensitivität der Triplex-PCR wurde an Verdünnungsreihen mit einem DNA-Gemisch aus *F. culmorum* und *F. graminearum* überprüft. Die Detektion von $9 \cdot 10^{-5}$ µg DNA pro Reaktionsansatz war möglich. Diese Nachweisgrenze liegt in dem Bereich, der mit Einzel-

PCR-Reaktionen ebenfalls erreicht wird und ist so zu einem Einsatz zur routinemäßigen Überprüfung von Getreide geeignet.

4.3.1.2. Spezifität der Triplex-PCR

Für eine verlässliche Aussage über die Kontamination von Getreide mit *Fusarium*-Arten muss die jeweils verwendete Nachweismethode auf ihre Spezifität hin getestet werden. Obwohl die verwendeten Primer-Paare in Einzel-PCR-Reaktionen auf Spezifität getestet wurden (Schilling *et al.* 1996, Niessen und Vogel 1997, Niessen und Vogel 1998), musste nach der Änderung der Reaktionsbedingungen in der Triplex-PCR diese Überprüfung wiederholt werden, da diese einen Einfluss auf die Spezifität haben.

Die Überprüfung, ob die Triplex-PCR alle Trichothecenbildenden *Fusarium*-Arten umfasst, führte zu einem positiven Resultat. Die getesteten Stämme ergaben alle das passende Signal, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität. Der Unterschied in der Signalstärke beruht neben unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der DNA-Isolate eventuell auch auf einer unterschiedlichen Qualität der DNA und wird in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer-Paar genauso gesehen.

Darüber hinaus sollte ausgeschlossen werden können, dass DNA anderer Organismen zu einem fälschlicherweise positiven Resultat führt. Aus diesem Grund wurden DNA-Isolate aus anderen Pilzen, Bakterien und auch Pflanzen eingesetzt. Es konnten keine positiven Signale detektiert werden. Unerwünschte Kreuzreaktionen mit DNA-Sequenzen solcher Organismen können also ausgeschlossen werden. Für die Anwendung der Triplex-PCR bei der Untersuchung von Getreide ist es wichtig, dass die DNA des Getreides nicht zu einem PCR-Signal führt. Dies wurde an Weizen- und Gerste-DNA untersucht und führte zu dem gewünschten Ergebnis.

Die Spezifität der Triplex-PCR konnte somit gezeigt werden.

4.3.1.3. Einsatz der Triplex-PCR zur Untersuchung von mit *Fusarium*-Arten kontaminiertem Weizen

Die Entwicklung der Triplex-PCR erfolgte mit DNA-Isolaten aus *Fusarium*-Rein-Kulturen. Für die Anwendung der Methode an praxisrelevanten Proben folgte die Untersuchung von kontaminiertem Getreide. Für die 100 untersuchten Weizenproben waren die Daten über den Befall mit *Fusarium*-Arten vorhanden. Die Übereinstimmung zwischen PCR-Signal und

Kontamination war sehr hoch, wenn die Kontamination über 3 % der befallenen Körner lag. Vor allem der gruppenspezifische Nachweis zeigte höchste Konformität. Die Ergebnisse sprechen für einen Einsatz der Triplex-PCR in einem Screening von Getreide auf *Fusarium*-Arten. Die Sensitivität ist auch bei Getreideproben ausreichend. Kontaminationen unter 3 % können in den meisten Fällen vernachlässigt werden, da die Wahrscheinlichkeit einer Gefährdung z.B. durch Mykotoxinbildung sehr gering ist. Für Brauereien wurde eine Kontamination von über 5 % in einer Probe mit *F. graminearum* bzw. *F. culmorum* als Grenzwert für die Auslösung von Gushing gefunden (Niessen *et al.* 1991).

4.3.1.4. Triplex-PCR-Resultate im Vergleich mit DON-Konzentrationen von Getreide

Die Triplex-PCR ermöglicht die simultane Detektion von *F. graminearum*, *F. culmorum* und der Gruppe der Trichothecenbildner. Somit steht eine Methode zur Verfügung, um schnell Zusammenhänge zwischen dem Auftreten dieser Organismen und anderen Parametern aufzudecken. Ein solcher Hintergrund lag in der Untersuchung von Weizen, der mit DON kontaminiert war. Die DNA dieses Weizen wurde in die Triplex-PCR eingesetzt. Ein sicherer Nachweis einer Kontamination mit Hilfe der Triplex-PCR konnte ab einem DON-Gehalt von 400 ppb durchgeführt werden. Unter diesem Wert sind die PCR-Signale sehr schwach. Darüber hinaus zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DON und dem Nachweis von *F. graminearum* bzw. der Gruppe der Trichothecenbildner. Da der PCR-Nachweis der Gruppe der Trichothecenbildner auf der Gensequenz eines Schlüsselenzyms der Biosynthese der Trichothecene beruht (Niessen und Vogel 1998), war dieses Ergebnis zu erwarten. Eine positive Korrelation zwischen der Menge an Trichothecenbildenden *Fusarium*-Arten und DON wird auch von Edwards *et al.* (2001) und Schnerr *et al.* (2002) bestätigt. Die Autoren stützten ihre Untersuchungen ebenfalls auf das Trichodien-Synthasegen. *F. graminearum* ist einer der Hauptproduzenten von Deoxynivalenol (Miller *et al.* 1983, Rotter und Prelusky 1995) und der Zusammenhang zwischen PCR-Nachweis und DON-Gehalt ist ebenfalls gegeben. Auch *F. culmorum* produziert das Trichothecen DON (Greenhalgh *et al.* 1986). Trotz dieser Tatsache konnte kein Zusammenhang gesehen werden zwischen dem Auftreten eines PCR-Signals und der DON-Konzentrationen der betreffenden Proben. Es handelte sich um Proben verschiedener Herkunft, so dass ein Einfluss des Probenmaterials ausgeschlossen werden kann. In diesen Proben scheint das Vorkommen von *F. culmorum* für die DON-Konzentration von geringer Bedeutung zu sein. Das Toxin wurde demnach überwiegend von *F. graminearum* gebildet.

4.3.2. Einsatz einer Rapidcycler-PCR

Die Verwendung von PCR-Methoden zur Detektion von *Fusarium*-Arten in Getreide führt zu wesentlich schnelleren Resultaten als eine mikrobiologische Analyse. Eine herkömmliche PCR in einem handelsüblichen Thermocycler dauert etwa zwei Stunden. Für das Screening von Getreideproben auf Kontaminationen wären allerdings noch kürzere Analysezeiten wünschenswert.

Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, ist der Einsatz von PCR-Cyclern, die im Unterschied zu Thermocyclern mit Metallblöcken ein anderes Heizprinzip besitzen. Beispiele für solche Cycler sind der Rapidcycler und der daraus weiterentwickelte LightCycler™. Der Wärmeübertrag erfolgt dabei über die Luft, die eine hohe Wärmekapazität besitzt (Wittwer *et al.* 1989, 1990). Dadurch kann innerhalb weniger Sekunden die gewünschte Temperatur erreicht werden. Die Abkühlung erfolgt durch Ansaugen der Raumluft. Die PCR-Reaktion wird in Glaskapillaren durchgeführt, die ein optimales Oberflächen-Volumen-Verhältnis haben, wodurch der Reaktionsmix sehr schnell die gewünschte Temperatur erreicht. Darüber hinaus wird ein Volumenverlust durch Verdunstung ausgeschlossen, da die Kapillaren hermetisch abgeschlossen sind. Die Reaktionsschritte einer PCR wie z.B. das Annealing der Primer verlaufen in wenigen Sekunden (Wittwer *et al.* 1990). Aus diesem Grund muss die Temperatur nur kurz konstant gehalten werden. Der schnelle Übergang zwischen den Temperaturstufen kann mit dem Einsatz eines Rapidcyclers oder eines ähnlichen Gerätes optimiert werden. Die Durchführung der PCR dauert nur noch 20 – 30 Minuten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Reaktionen auch spezifischer werden, da in der kurzen Zeit weniger falsche Primer-Bindungen auftreten.

Eine Rapid-Cycler-PCR-Protokoll wurde für die Detektion von *F. graminearum* und für die Gruppe der Trichothecenbildner entwickelt. Die PCR konnte in 30 Minuten durchgeführt werden. Die Sensitivität der PCR lag mit $2 \cdot 10^{-5}$ µg DNA pro Ansatz im gleichen Bereich wie Einzel-PCR-Reaktionen bzw. die Triplex-PCR ($9 \cdot 10^{-5}$) in einem herkömmlichen Thermocycler. Ein Einsatz dieser Methode zur Analyse eines Befalls mit *Fusarium*-Arten ist möglich und bietet den Vorteil einer zeitsparenden Durchführung.

4.3.3. Strand Displacement Amplification (SDA)

Eine zur PCR alternative DNA-Amplifikationsmethode stellt das Strand Displacement dar (Walker *et al.* 1992, Walker 1993, Nadeau *et al.* 1999). Diese Technik bietet die Möglichkeit, die Amplifikation bei konstanter Temperatur durchzuführen, wodurch der technische

Aufwand minimiert wird, da nur ein Wasserbad benötigt wird. Die Methode beruht auf der Fähigkeit eines Restriktionsenzym, den unmodifizierten Strang einer mit Schwefel markierten Erkennungssequenz zu schneiden und die Fähigkeit einer DNA Polymerase, die Replikation an der Schnittstelle zu beginnen und einen der beiden DNA-Stränge zu verdrängen. Die Amplifikation erfolgt durch eine Kopplung zwischen Reaktionen, bei denen die Stränge zunächst verdrängt werden und dann als Ziel für weitere Amplifikationsschritte dienen. Die Methode wird in der Literatur zur Detektion von verschiedensten Organismen beschrieben. Der Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (Walker *et al.* 1992, 1993, Milla *et al.* 1997, Ichiyama und Ito 1997, Spargo *et al.* 1996), *Chlamydia trachomatis* (Spears *et al.* 1997, Little *et al.* 1999), *Neisseria gonorrhoeae* (Little *et al.* 1999) und das HIV-Virus (Nycz *et al.* 1998) konnte mit dieser Methode durchgeführt werden.

Für die Untersuchung der Anwendbarkeit von SDA zur Detektion von *Fusarium*-Arten wurden passende Primer konstruiert, die einen Sequenzbereich des *Tri5*-Gens umfassen. Dabei wurde ein Primer (Tox5-1) verwendet, der in den PCR-Protokollen zum Nachweis von Trichothecenbildnern ebenfalls verwendet wird (Niessen und Vogel 1998). Dieser Primer wurde mit einem weiteren Oligonukleotid kombiniert, das ebenfalls aus der *Tri5*-Sequenz abgeleitet wurde. Die Primerpaare ergaben, alleine in eine PCR eingesetzt, positive Signale, so dass ihr Funktionsfähigkeit gewährleistet war.

Zunächst wurden das Restriktionsenzym *Ava I* aus der Alge *Anabaena variabilis* und das *exo*⁻Klenow-Fragment der *Escherichia coli* – Polymerase I in die Reaktion eingesetzt. Laut Literatur wird mit diesem System eine 10⁸fache Amplifikation bei 40 °C in zwei Stunden erreicht (Milla *et al.* 1997). Bei Verwendung der Primer zur Detektion von *Fusarium*-Arten konnte jedoch kein positives Resultat erzielt werden. Es wurde daraufhin ein weiteres System getestet, in dem das Restriktionsenzym *BsoBI* und ein Klenow-Typ-Fragment der *Bst*-Polymerase (Lu *et al.* 1991) aus *Bacillus stearothermophilus* verwendet wird. Innerhalb von 30 Minuten kann nach Literaturangaben hiermit eine 10¹⁰fache Amplifikation bei einer Temperatur von 60 °C erreicht werden. Darüber hinaus soll diese Reaktion spezifischere Signale ergeben (Spears *et al.* 1997).

Dieser Ansatz ergab wiederum keine positiven Signale. Eine Vielzahl von verschiedenen Parametern wie die Reaktionspufferzusammensetzung und die Reaktionstemperaturen wurden variiert, führten jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg. Da die einzelnen Reagenzien und die Primer unabhängig voneinander getestet wurden, kann ausgeschlossen werden, dass hier der Grund für das negative Resultat liegt. Es ist eher zu erwarten, dass die Probleme in dem komplexen Aufbau des Reaktionsmechanismus liegen. Neben der passenden Bindung der

Primer, müssen das Restriktionsenzym und die Polymerase zur richtigen Zeit arbeiten. Es handelt sich um eine Abfolge von Reaktionen, die stark miteinander verbunden sind, bzw. voneinander abhängen und bei der Fehlfunktion nur eines kleinen Schrittes ist die Gesamtreaktion gefährdet. Da ein Ergebnis nur nach Ablauf aller Reaktionsschritte zu sehen ist, kann nicht untersucht werden, an welcher Stelle eine fehlerhafte Reaktion abläuft.

Sämtliche Ansätze waren ohne Erfolg und aus diesem Grund wurden die Versuche zum Nachweis von *Fusarium*-Arten mit Hilfe der Strand Displacement Amplification eingestellt. Die Schlussfolgerung ist, dass diese Methode unter den getesteten Bedingungen sich nicht für diese Anwendung eignet.

4.3.4. Anwendung von DNA Detection Test Strips™ zur Detektion von *Fusarium*-Arten

Zur schnellen Detektion von *Fusarium*-Arten können verschiedene PCR-Methoden eingesetzt werden. Diese sind im Vergleich zu mikrobiologischen Analysen wesentlich schneller. Eine weitere Verkürzung der Analysezeit ist jedoch erwünscht. Der Einsatz des Rapidcycler zur Durchführung verkürzt die Dauer der PCR auf 30 Minuten. Zur Detektion der PCR-Produkte nach der PCR wird meist eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Färbung mit fluoreszierenden DNA-Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR® Green I durchgeführt. Die Elektrophorese benötigt meist mehr als eine Stunde und die Farbstoffe sind gesundheitsschädlich. Aus diesem Grund wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Zeit für die Detektion der PCR-Produkte zu verringern.

Der Einsatz von DNA Detection Test Strips™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) ist eine schnelle und sehr einfach durchzuführende Methode, bei der keine gesundheitsschädlichen Reagenzien verwendet werden. Darüber hinaus ist ausser einem Wasserbad oder einem Heizblock keine weitere technische Ausstattung nötig. Das Detektionsprinzip beruht darauf, dass ein sowohl mit Digoxigenin als auch Biotin markiertes PCR-Produkt auf dem Teststreifen eine Bindung mit Anti-Dig-Antikörpern und Streptavidin eingeht, was zu spezifischen Reaktionen und somit einer Detektion führt.

Die Durchführung der Reaktion zur Detektion von *Fusarium*-DNA war sehr einfach. Die PCR-Produkte wurden fünf Minuten mit einer Biotin-Sonde hybridisiert und nach einer Inkubation für weitere fünf Minuten auf Eis auf den Test Strip™ pipettiert. Nach zehn Minuten Entwicklung konnte das Ergebnis auf dem DNA Detection Test Strip™ abgelesen werden (Knoll *et al.* 2002). Die Gesamtdauer der Reaktion betrug somit 20 Minuten, was im

Vergleich zur Detektion in einem Agarosegel mit 70 Minuten Dauer, eine wesentliche Verbesserung darstellt. Die Spezifität wird zum einen durch die Primer (Niessen und Vogel 1997), zum anderen durch die Oligonukleotidsonde gewährleistet, die spezifisch für die Sequenz des PCR-Produktes ist. Unspezifische PCR-Produkte werden nicht detektiert. Allerdings kann im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese die Grösse des PCR-Fragments nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund eignet sich die Methode bevorzugt für PCR-Protokolle, die schon optimiert und getestet sind. Durch die Verwendung einer Detektionssonde erfolgt jedoch eine Bestätigungsreaktion der Sequenz.

Die Sensitivität der Detektion ist bei Einsatz von reiner DNA vergleichbar mit derjenigen bei einer Färbung mit Ethidiumbromid. Diese Beobachtung machte auch Klepp (2000), der eine Sensitivität von 10 ng Ausgangs-DNA angibt. Weitere Autoren berichten von einer Detektion von 5 ng DNA mit den Test StripsTM (Klüber *et al.* 2001). Bei der Detektion von *Fusarium*-DNA war ein Nachweis von 0,3 ng DNA möglich (Knoll *et al.* 2002). Bei der Untersuchung der Anwendbarkeit der Methode mit *Fusarium*-DNA aus Getreideproben zeigte die Detektion im Agarosegel eine leicht höhere Sensitivität als der Nachweis mit Hilfe der Test StripsTM. Eine Erklärung dafür ist, dass die Test StripsTM etwas weniger sensitiv sind als die Detektion im Agarosegel ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass DNA-Lösungen, die aus einer Getreideextraktion stammen, im Gegensatz zu reinen DNA-Lösungen inhibitorische Substanzen enthalten, die eventuell die Reaktionen für bzw. auf dem Test StripTM wie die Hybridisierung bzw. die Antikörperbindung stören.

Für ein schnelles Screening von Getreideproben auf *Fusarium*-Kontamination ist der Einsatz der DNA Detection Test StripsTM jedoch gut geeignet.

4.4. Vergleich von PCR-Resultaten mit dem Gushing-Test

Ein Schimmelpilzbefall wird als eine der Ursachen für das Auftreten von Gushing betrachtet (Amaha *et al.* 1973, Gjertsen *et al.* 1963, Niessen *et al.* 1991). Die visuelle Beurteilung des Malzes anhand des Auftretens relevanter Körner bedarf jedoch einiger Erfahrung der Person, die die Untersuchung durchführt (Niessen *et al.* 1991). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die zur Verfügung stehenden PCR-Methoden zur Detektion von *Fusarium*-Arten in einen Zusammenhang mit den Ergebnissen des Gushing-Testes nach Donhauser *et al.* (1990) zu bringen sind.

Aus Malzen mit Überschäumvolumina zwischen 8 ml und 233 ml wurde DNA extrahiert und eine PCR zum Nachweis von Trichothecenbildnern durchgeführt. Dabei konnte nur in 49 %

der Malzproben ein positives PCR-Signal detektiert werden. Da die PCR-Methode sehr sensitiv ist und selbst nur Spuren einer Kontamination detektieren kann und einzelne Körner als Auslöser von Gushing dienen können (Niessen *et al.* 1991), ist dieses Ergebnis zunächst verwunderlich. Bei einer Untersuchung von Brauweizen konnten Hernandez *et al.* (2000) allerdings ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Befallsstärke und Gushingneigung finden. Eine Erklärung für das Ergebnis, dass PCR und Gushing-Test keinen Zusammenhang zeigen, könnte sein, dass es sich um den Vergleich zweier sehr verschiedener Methoden handelt, die jeweils Fehlerquellen enthalten. Vorteilhafter würde ein direkter Vergleich zwischen PCR und dem tatsächlichen Auftreten von Gushing sein, so dass eine gesicherte Aussage getroffen werden könnte.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob das verwendete PCR-System einen geeigneten Marker verwendet. Die eingesetzte PCR zielt auf ein Gen, das bei der Trichothecenbiosynthese von grosser Bedeutung ist. Die Verwendung dieser Sequenz ist geeignet zur Abschätzung der Mykotoxinbildung. Zur Beurteilung des Malzes auf Gushingneigung kann dies jedoch nicht beitragen.

In der Ursachenforschung von Gushing konnten kürzlich hydrophobe Proteine, sogenannte Hydrophobine, isoliert werden, die als auslösende Faktoren für Gushing genannt werden (Kleemola *et al.* 2001, Hippeli und Elstner 2002). Diese Proteine bzw. die passende Gensequenz wären die geeigneteren Marker für ein Untersuchung des Auftretens des Phänomens Gushing.

4.5. Analyse der Mykotoxinbildung

4.5.1. Etablierung einer Methode zur Untersuchung der Genexpression des Tri5-Gens

Im Biosyntheseweg von Trichothecenen spielen zahlreiche Gene eine Rolle (Zamir *et al.* 1991, Desjardins *et al.* 1993, Trapp *et al.* 1998, Zamir *et al.* 1999). Ein entscheidendes Gen ist das Tri5-Gen, dessen Produkt den ersten Schritt im Biosyntheseweg, die Bildung von Trichodien aus Farnesylpyrophosphat, katalysiert (Hohn und Beremand 1989). Um Ursachen bzw. Faktoren aufdecken zu können, die bei der Mykotoxinbildung eine Rolle spielen, war das Ziel, eine Methode zu entwickeln, mit der die Expression des Tri5-Gens quantitativ untersucht werden kann. Darüber hinaus kann man mit einem solchen System Hinweise darauf finden, wie wichtig diese Expression für das Auftreten des Toxins tatsächlich ist. Da

der Biosyntheseweg sehr komplex ist, kommt es zu zahlreichen weiteren Regulationsschritten sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene. Eine Expression des Tri5-Gens muss also nicht zwangsläufig zur Bildung von Trichothecenen führen.

Zur Untersuchung der Genexpression stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Dazu zählen Northern Blot, in situ-Hybridisierung, RNase Protection Assay, cDNA-Arrays und RT-PCR. Die quantitative RT-PCR ist aufgrund ihrer grossen Genauigkeit und Sensitivität inzwischen die Methode der Wahl, um Genexpression zu messen (Giulietti *et al.* 2001, Prediger 2001, Halford *et al.* 1999). Die Untersuchung der Expression von pilzlichen Genen mit Hilfe der RT-PCR wurde schon von verschiedenen Autoren beschrieben (Lamar *et al.* 1995, Benito *et al.* 1996, Doohan *et al.* 1999).

Aus den oben genannten Gründen wurde auch in dieser Arbeit eine quantitative RT-PCR zur Messung der Expression des Tri5-Gens verwendet. Die beiden Schritte Reverse Transkription und PCR wurden getrennt voneinander durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass das RT-Produkt in verschiedene PCR-Ansätze eingesetzt werden konnte. Um eine Aussage über die Stärke der Expression eines Gens machen zu können, muss diese mit der Genexpression eines konstitutiv exprimierten Gens verglichen werden. Für die Untersuchung an *Fusarium*-Arten wurde das β -Tubulin-Gen ausgewählt (Donaldson *et al.* 1995, Glass *et al.* 1995). In Versuchen zur Genexpression von *Fusarium*-Arten im Hinblick auf die Infektion von Pflanzen, wurde dieses Gen ebenfalls als Referenz verwendet (Doohan *et al.* 1999). Für die Quantifizierung des Tri5-Gens stehen mehrere Protokolle zur Verfügung. Ziel der Arbeit war, eine Quantifizierung in Echtzeit im LightCyclerTM durchzuführen. Diese Technologie ermöglicht eine sehr sensitive und schnelle Quantifizierung (Giulietti *et al.* 2001). Selbst sehr geringe Mengen an DNA bzw. cDNA können detektiert werden. Da es Ziel war, bei der Untersuchung von *Fusarium*-Kulturen auch sehr frühe Zeitpunkte zu beobachten, muss die Methode sehr empfindlich sein, da hier nur sehr geringe Myzelmengen vorliegen und nur geringe RNA bzw. cDNA-Gehalte zu erwarten sind. Eine Methode zur Quantifizierung des Tri5-Gens mit Hilfe der LightCyclerTM-PCR wurde von Schnerr *et al.* (2001) entwickelt. Für die Anwendung in der RT-PCR war das dort verwendete Primer-Paar jedoch nicht geeignet, da das entstehende PCR-Produkt mit 658 bp sehr gross ist. Das Fragment des β -Tubulin-Gens ist um über 300 bp kleiner. Da es Ziel war, die Produkte direkt miteinander vergleichen zu können, war dieser Unterschied nicht akzeptabel. Je ähnlicher die Fragmente in der Grösse sind, desto besser ist ein Vergleich möglich. Ein passendes Primer-Paar wurde bei Edwards *et al.* (2001) gefunden. Die Autoren beschreiben eine PCR basierend auf dem Tri5-Gen, die ein

260 bp grosses Fragment amplifiziert. Eine gute Vergleichbarkeit mit der β -Tubulin-PCR konnte somit gewährleistet werden.

Dieser Vorteil zeigte sich auch bei der Entwicklung der Methode. Die PCR der RT-Produkte konnte für beide Primer-Paare mit dem gleichen Programm durchgeführt werden. Zur Kontrolle, dass keine DNA die Reaktion kontaminiert, sondern die Signale ausschließlich von mRNA bzw. cDNA stammen, wurde von jeder Probe ein Aliquot der RNA-Lösung eingesetzt, die nicht der Reversen Transkription unterzogen wurde. In diesen Fällen durfte kein Signal zu sehen sein.

Die Expression des β -Tubulin-Gen konnte in allen Proben als gleich starkes Signal gemessen werden. Sie eignete sich daher als Referenz zur Quantifizierung der Tri5-Expression. Die Tri5-Expression trat nur in einigen Proben auf und wurde in der Auswertung prozentual zur β -Tubulin-Expression angegeben. Mit dieser Methode war eine Beobachtung der Tri5-Expression unter verschiedenen Bedingungen möglich.

4.5.2. Beeinflussende Faktoren der Mykotoxinbildung

Zur Untersuchung der Faktoren, die bei der Mykotoxinbildung eine Rolle spielen, wurden verschiedenen Variationen bei der Kultivierung von *Fusarium*-Arten getestet. Zunächst sollten verschiedene Kulturmedien verglichen werden. Ein GYEP-Medium wurde mit zwei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen eingesetzt. Darüber hinaus wurde ein Medium verwendet, das aus Reismehl hergestellt wird. Dieses Medium wurde von Misra und Sinha (1979) eingesetzt zur Untersuchung der Aflatoxinbildung bei *Aspergillus flavus*. In den Versuchen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigte sich jedoch, dass die Verwendung des Reismehlmediums zur Untersuchung der DON-Bildung meist zu geringeren Toxinmengen führte als die Verwendung der GYEP-Medien. Darüber hinaus kann bei der Herstellung des Mediums eine konstante Zusammensetzung nicht gewährleistet werden, da das Kochen des Reismehls jeweils zu einer anderen Konsistenz führt und nach dem Abzentrifugieren jeweils unterschiedliche Mengen in die weitere Verarbeitung eingesetzt werden. Diese methodischen Probleme sprachen und sprechen gegen eine weitere Verwendung dieses Mediums. Aus diesem Grund wurde bei Versuchen zur Genexpression dieses Medium nicht mehr verwendet.

Das GYEP-Medium führte in Untersuchungen zur DON-Bildung im Vergleich mit anderen Medien zu den höchsten DON-Gehalten (Miller *et al.* 1983). Die Autoren zeigten auch, dass

ein pH-Wert von 6,5 zu Beginn des Versuches zu der grössten Produktion an DON führt. Aus diesem Grund wurde dieser pH-Wert für die Untersuchungen verwendet.

Geeignete Kandidaten für vergleichende Untersuchungen zur Mykotoxinbildung sollten prinzipiell die Fähigkeit zur Mykotoxinbildung haben und diese muss auch induzierbar sein. Aus diesem Grund wurden potentielle trichothecenbildende *Fusarium*-Arten auf Mykotoxinbildung getestet. Dabei handelte es sich um drei *F. culmorum*-Stämme und sechs *F. graminearum*-Stämme. Zwei der *F. culmorum*-Stämme bildeten erst nach sehr langer Inkubationszeit in einem sehr kurzen Zeitraum DON. *F. culmorum* TMW 4.0754 zeigte eine konstantere Bildung von 3-AcDON bzw. DON und wurde für weitere Untersuchungen ausgesucht. Bei den *F. graminearum*-Stämmen zeigten sich z.T. sehr ähnliche Verläufe in der Mykotoxinbildung, wobei meist erst nach längerer Inkubation eine DON-Bildung zu messen war. Aus diesen Stämmen wurde *F. graminearum* TMW 4.0122 für weitere Versuche ausgewählt.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, in wieweit die Expression des Tri5-Gens mit dem tatsächlichen Auftreten von DON in Zusammenhang steht, wurden mit den beiden Stämmen *F. culmorum* TMW 4.0754 und *F. graminearum* TMW 4.0122 Versuche zur Genexpression im Vergleich mit der Mykotoxinbildung durchgeführt. Wiederum erfolgte eine Variation der Kulturbedingungen.

Die Inkubation von *F. culmorum* TMW 4.0754 in einem Medium mit 10 g/l Glucose ergab wesentlich niedrigere DON-Gehalte als ein Wachstum des Pilzes unter ansonsten gleichen Bedingungen bei 2,5 g/l Glucose. Ähnliche Beobachtungen haben Miller *et al.* (1983) gemacht, die eine Abnahme von DON bei steigendem Kohlenhydratgehalt beschreiben. Die Menge an 3-AcDON war dahingegen in den Untersuchungen von Miller *et al.* bei dem höheren Glucosegehalt grösser. Die Versuche mit *F. culmorum* TMW 4.0754 konnten diese Aussage nicht bestätigen. Eine Verringerung des Kohlenhydratgehaltes scheint hier die DON-Produktion zu stimulieren. Da es sich bei den Mykotoxinen um Sekundärmetabolite handelt, die oft z.B. aufgrund von Stressreaktionen gebildet werden, könnte Nahrungsstress eine mögliche Erklärung für das beobachtete Verhalten sein. Darüber hinaus wird DON eine Rolle bei der Infektion von Pflanzen zugeschrieben. Eventuell ist auch hier der Mangel an Kohlenhydraten ein Auslöser für die Induktion von Infektionsmechanismen.

Bei beiden Stämmen wurde beobachtet, dass bei niedrigen Temperaturen weniger DON gebildet wird als bei höheren Temperaturen. Versuche zum Einfluss der Temperatur wurden schon von verschiedenen Autoren beschrieben, die jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse gefunden haben. Die optimale Temperatur für die DON-Produktion lag auch bei

Untersuchungen von Miller *et al.* (1983) bei 28°C. Bei Versuchen, bei denen die Temperatur in zyklischen Schritten während der Inkubation verändert wurde, konnten Ryu und Bullerman (1999) zeigen, dass der DON-Gehalt am höchsten ist, wenn nach einer zweiwöchigen Inkubation von 25 °C, eine Inkubation mit 15 °C erfolgt. Allerdings erfolgte hier die Toxinbildung erst nach vier bis sechs Wochen. Dahingegen stellten Homdork *et al.* (2000) fest, dass warme Bedingungen die Toxinbildung fördern. Das untersuchte Material war hierbei schwach bis mittelstark befallener Weizen. Verschiedene Parameter und ihr Einfluss auf das Wachstum von *Fusarium*-Arten bzw. die Mykotoxinbildung während der Mälzung wurden von Böhm-Schraml (1995) beschrieben. So nimmt z.B. die Belastung mit *Fusarium*-Arten mit der Keimdauer des Malzes zu. Entsprechend erhöhten sich auch die Toxinmengen. Allerdings wirkte sich eine Mälzung mit fallenden Temperaturen von 18 °C bis 12 °C positiv auf die DON-Bildung aus. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde bei *F. graminearum* TMW 4.0122 bei 15 °C ebenfalls eine Toxinbildung nach drei Tagen und nach acht Tagen gesehen. Im Gegensatz dazu wurde von *F. culmorum* TMW 4.0754 bei 10 °C kaum Toxin gebildet. In wieweit sich Versuche in Kulturmedium mit den Verhältnissen während der Mälzung vergleichen lassen, ist jedoch unklar.

Die Temperaturabhängigkeit der Mykotoxinbildung konnte noch nicht hinreichend geklärt werden. Eventuell liegt eher ein Zusammenhang mit dem Wachstumsstatus der Pilze vor. Bei einer geringeren Temperatur kann von einer verminderten Wachstumsgeschwindigkeit ausgegangen werden. In den durchgeführten Versuchen wurden Temperaturen von 10 °C, 15 °C und 28 °C eingesetzt, allerdings wurden verschiedene *Fusarium*-Arten verwendet. Bei der niedrigsten Temperatur ist ein Anstieg des DON-Gehaltes noch am Schluss der Inkubation zu sehen. Dieser Zustand könnte demjenigen entsprechen, der bei 28 °C schon nach 10 Tagen erreicht wurde. Eine Korrelation der Biomasse bzw. des Wachstums mit der DON-Produktion wird von verschiedensten Autoren jedoch bestritten (Doohan *et al.* 1999, Ryu und Bullerman 1999, Birzele *et al.* 2000). Die Schwierigkeit, diese Fragestellung zu untersuchen liegt auch darin, dass in Flüssigkulturen allgemein weniger Toxin gebildet wird als auf festen Substraten. In Flüssigkultur wiederum wird in statischer Kultur mehr Toxin gebildet (Miller *et al.* 1983). Aus diesem Grund wurden die Versuche in der vorliegenden Arbeit in statischer Kultur durchgeführt, wobei jedoch eine Biomassebestimmung erschwert wird. Die visuelle Beobachtung der Kulturen liefert nur ungenaue Hinweise über den Wachstumszustand. Allerdings war bei den Versuchen zu sehen, dass das Wachstum bei niedrigen Temperaturen nur einige Tage zeitverzögert ist.

Die Bildung von 3-AcDON im Zusammenhang mit der DON-Bildung zeigte einen uneinheitlichen Verlauf. Erwartungsgemäß sollten 3-AcDON und DON zeitversetzt nacheinander auftreten (Miller et al. 1983, Schuster et al. 1987). Das typische Muster, dass zunächst 3-AcDON ansteigt, wieder abnimmt und dann DON gebildet wird, war in einigen Versuchen zu sehen. Die Konzentration von 3-AcDON war jedoch meist sehr niedrig. Allerdings konnte in manchen Kulturen vor der Bildung von DON kein 3-AcDON gemessen werden. Für den Schritt von 3-AcDON zu DON wird in der Literatur eine 3-O-Acetyltransferase beschrieben (Kimura et al. 1998). Eventuell wird diese erst ab einer bestimmten Konzentration von 3-AcDON aktiviert. Eine Akkumulation von 3-AcDON vor der Bildung von DON könnte somit erklärt werden. In anderen Fällen scheint die Bildung von DON hiervon abgekoppelt zu sein, da es zu keiner Akkumulation von 3-AcDON kommt. Die Regulation erfolgt wahrscheinlich an einer anderen Stelle des Biosyntheseweges. Die Untersuchung der Expression des Tri101-Gens, das für die 3-O-Acetyltransferase kodiert, könnte neben der Analyse des Tri5-Gens, weitere Erkenntnisse über die Regulation der DON-Bildung ergeben.

Die DON-Bildung in den Versuchen mit den Stämmen *F. culmorum* TMW 4.0754 und *F. graminearum* TMW 4.0122 zeigte einen unerwarteten Verlauf. Die Detektion von DON war nur über einen kurzen Zeitraum von meist wenigen Tagen möglich, danach nahmen die Werte wieder ab. Mykotoxine gelten als sehr stabil (Wolf und Bullerman 1997) und einmal produzierte Mengen müssten auch nach einiger Zeit noch nachweisbar sein. Allerdings besteht die Möglichkeit der Maskierung der Mykotoxine durch Bindung an bestimmte Substanzen, z.B. β -Glucane (Stettner 2001). Dies könnte eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung sein und müsste in weiterführenden Untersuchungen beobachtet werden. Eine enzymatische Behandlung könnte die Bindung der Toxine mit anderen Substanzen spalten. DON, falls vorhanden, könnte dann gemessen werden. Bei *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* wurde von Doyle und Marth (1978) beobachtet, dass zuvor gebildetes Toxin von den Organismen wieder absorbiert wird. Es ist möglich, dass dies bei *Fusarium*-Arten ebenfalls der Fall ist.

Die Untersuchung der Genexpression könnte als Alternative zur Messung der Toxine dienen, da die Expression des Gens und die Toxinbildung parallel verlaufen. Bei der Beobachtung der Expression des Tri5-Gens war jedoch zu beobachten, dass diese nicht in allen Fällen direkt zu einer Bildung eines Toxins führte. In diesen Fällen muss die Regulation zur Toxinbildung noch an einer anderen Stelle aktiv sein. Vorstellbar sind hier mehrere Möglichkeiten. Der Biosyntheseweg ist sehr komplex und ist durch eine Vielzahl von enzymatischen Schritten

bestimmt, die wiederum von der Transkription verschiedener Gene abhängen (Zamir *et al.* 1991, Desjardins *et al.* 1993, Trapp *et al.* , Zamir *et al.* 1999). Die Expression des Tri5-Gens ist sicher ein wichtiger, aber auch nur der erste Schritt. Danach muss eine Vielzahl von weiteren Genen aktiviert werden. Es gibt es mehrere regulatorische Gene (Hohn *et al.* 1999, Matsumoto *et al.* 1999, Tag *et al.* 2001), die z.B. an Promotorregionen von anderen Genen binden können und die Transkription beeinflussen. Darüber hinaus kann auch eine posttranslationale Regulation auf Proteinebene erfolgen. Solche regulatorischen Schritte spielen bei der Mykotoxinbildung sicher eine wichtige Rolle und mit der Untersuchung von Genexpressionen erhält man zumindest einen Hinweis darauf, in welchen Fällen sich weitere Untersuchungen lohnen könnten. Darüber hinaus könnten sich eventuell Schlussfolgerungen ergeben, die zeigen, welche Rolle Einflussfaktoren von aussen, z.B. Temperatur spielen und an welcher Stelle dies reguliert wird. Es könnte untersucht werden, in welchem Wachstumsstadium der Pilze die Biosynthese beginnt bzw. ob überhaupt ein Zusammenhang zu sehen ist.

Die Methode der RNA-Isolierung und der quantitativen RT-PCR könnte für die Untersuchung weiterer Gene im Biosyntheseweg der Trichothecene dienen. Je mehr Wissen man über die genetische Regulation der Biosynthese hat, desto eher könnte man versuchen, Einfluss darauf zu nehmen und die Mykotoxinbildung zu verringern oder zu vermeiden. Diese Zielsetzung ist vor allem für die Abschätzung des Risikos einer Mykotoxinproduktion bei der industriellen Verarbeitung von Getreide interessant. Ein Beispiel ist die Mälzung. Die Mykotoxine, im Speziellen DON, liegen während der Mälzung z.T. maskiert vor und können nicht detektiert werden (Stettner 2001). Diese Maskierung erfolgt durch Bindung an β -Glucane. Die RNA der Pilze hingegen unterliegt einer solchen Verschleierung nicht. Die neu entwickelte Methode zur RNA-Isolierung bzw. RT-PCR sollte aus diesem Grund an Getreide- bzw. Malzproben getestet werden. Eventuell würden sich dadurch neue Möglichkeiten ergeben, um die beeinflussenden Faktoren der Mykotoxinbildung auf molekularer Ebene zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt, die eine zuverlässige Beurteilung des Vorkommens von *Fusarium*-Arten auf Getreide ermöglichen. Da eine Anwendung im Screening von Getreide z.B. in Industriebetrieben als Ziel vorlag, musste vor allem auf die Möglichkeit einer schnellen, einfachen und präzisen Durchführung der Protokolle geachtet werden. Dies wurde durch die Entwicklung von DNA-gestützten Methoden erreicht.

Entscheidend für den Erfolg ist zunächst eine erfolgreiche Extraktion der Pilz-DNA aus dem Getreide. Durch Optimierung eines Extraktionsverfahrens konnte in nur wenigen Minuten sowohl aus Getreide als auch aus Malz qualitativ und quantitativ ausreichend DNA isoliert werden. Störsubstanzen aus dem pflanzlichen Material, die weitere Analysen hemmen könnten, wurden durch den Zusatz von Polyvinylpyrrolidon entfernt. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde bestätigt. Das Extraktionsverfahren kam bei zahlreichen Getreideproben zum Einsatz. Nach wie vor problematisch ist das Thema Probennahme zu sehen, das in der Arbeit nur modellhaft untersucht werden konnte. Jedoch ist dieser Einfluss auf die Resultate unabhängig von der verwendeten Detektionsmethode für *Fusarium*-Arten und muss als alleinstehender Faktor in Blickpunkt anderer Untersuchungen stehen.

Mehrere Methoden zur Analyse des *Fusarium*-Befalls auf Getreide wurden entwickelt. Zur parallelen Detektion von *F. graminearum*, *F. culmorum* und der Gruppe der Trichothecenbildner wurde eine Triplex-PCR erstellt und optimiert. Diese wurde auch zur Untersuchung von DON-kontaminiertem Weizen verwendet, um Vergleiche zwischen dem Nachweis der *Fusarium*-Arten und DON zu ziehen. In den untersuchten Proben gab es einen positiven Zusammenhang zwischen der DON-Konzentration und dem Nachweis von *F. graminearum* und der Gruppe der Trichothecenbildner, nicht aber von *F. culmorum*.

Zur Beschleunigung der Detektion wurde eine PCR im Rapid Cycler entwickelt, die die Durchführung der DNA-Amplifikation von zwei Stunden auf eine halbe Stunde reduziert.

Als Ersatz des Nachweises der PCR-Produkte auf einem Agarosegel wurden DNA Detection Test StripsTM eingesetzt. Nach 20 Minuten liegt das Ergebnis vor. Die Detektion im Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidfärbung benötigt mindestens 70 Minuten. Darüber hinaus ist keine besondere technische Ausstattung nötig und gesundheitsschädliche Substanzen wie die DNA-Farbstoffe Ethidiumbromid bzw. SYBR Green werden vermieden. Die Methode wurde für den Nachweis von *F. graminearum* entwickelt, ist jedoch mit jedem anderen PCR-Produkt nach entsprechender Anpassung durchführbar.

Als eine zur PCR alternative DNA-Amplifikationsmethode wurde das Strand Displacement getestet. Diese hat den Vorteil, bei isothermen Bedingungen abzulaufen, was den Bedarf an Geräten minimiert. Ein Thermocycler, der Temperaturwechsel durchführen kann, ist nicht nötig. Die Versuche zum Nachweis von *Fusarium*-Arten ergaben trotz einer Vielzahl von unterschiedlichen Ansätzen keine positiven Resultate. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass sich diese Methode nicht für diese Anwendung eignet.

Für einen Vergleich der Ergebnisse im Gushingtest mit PCR-Resultaten wurden Malzproben untersucht. Es konnte jedoch keine Übereinstimmung der Daten gefunden werden. Die PCR ist auf den Nachweis des Tri5-Gens gestützt und dies scheint nicht der richtige Marker zu sein. Inzwischen mehren sich die Hinweise darauf, dass sogenannte Hydrophobine ein auslösender Faktor von Gushing sind und weitere Untersuchungen sollten darauf zielen.

Um Erkenntnisse darüber zu erhalten, welche Faktoren die Mykotoxinbildung beeinflussen und ob das auch auf genetischer Ebene zu sehen ist, wurde eine Methode zur Messung der Genexpression des Tri5-Gens entwickelt. Dabei handelt es sich um eine quantitative RT-PCR, die im LightCyclerTM durchgeführt wurde. Die Expression des Tri5-Gens wurde in Relation zur jeweiligen Expression eines konstitutiv exprimierten Genes bestimmt.

Mehrere *Fusarium*-Arten wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, wobei DON-Bildung und Genexpression gemessen wurden. Es zeigte sich, dass bei einem niedrigeren Glucosegehalt im Medium und bei höheren Temperaturen mehr DON gebildet wird. Die Expression des Tri5-Gens konnte mit der Toxinbildung in Zusammenhang gebracht werden. In einigen Fällen folgte jedoch auf eine Expression keine DON-Bildung. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier eine spätere Regulation im Biosyntheseweg erfolgt.

Mit der entwickelten quantitativen RT-PCR ergeben sich zahlreiche neue Anwendungsmöglichkeiten, um die Regulation und die einwirkenden Faktoren der Trichothecenbildung auf molekularer Ebene zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hohn, T. M. (1998). The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichoides* encodes a cytochrom P-450 Monooxygenase required for C-15 hydroxylation in Trichothecene Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1):221-225.

Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hohn, T. M. (1999). Tri 12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichoides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics*. 261:977-984.

Amaha, K., Katsuaki, N., Yoshida, H. T. (1973). Gushing inducers produced by some mould strains. *Proceedings of the European Brewery Convention 14th Congress Salzburg*. 381-398.

Backhouse, D., Burgess, L. W., Summerell, B. A. (2001). Biogeography of *Fusarium*. In: *Fusarium- Paul Nelson Memorial Symposium*. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (eds.). APS Press, Minnesota.

Bai, S., Shaner, G. (1994). Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease*. 78:760-766.

Bakan, B., Pinson, L., Cahagnier, B., Melcion, D., Semon, E., Richard-Molard, D. (2001). Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives and Contaminants*. 18(11):998-1003.

Banks, J. N., Rizvi, R. H., Barker, I., Turner, J. A., Rahman, S., Northway, B. J. (1996). Specific monoclonal antibodies to *Fusarium* species and *Microdochium nivale*. *Food and Agricultural Immunology*. 8:249-268.

Beardall, J. M., Miller, J. D. (1994). Diseases with mycotoxins as possible causes. In: *Mycotoxins in Grain* (Edited by Miller, J. D. and Trenholm, H. L.) pp. 487-539 Eagan Press, St.Paul, MN.

Beck, R., Lepschy, J., Steinke, S., Süß, S. (1991). Untersuchungen zur Kenntnis der Mikrobiologie von Braugerste und Brauweizen. *Brauwelt*. 51/52:2472-2479.

Belgrader, P., Hansford, D., Kovacs, G. T. A., Ventakeswaran, K., Mariella, R., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Okuzumi, M., Pourahmadi, F., Northrup, M. A. (1999). A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis. *Analytical Chemistry*. 71:4232-4236.

Benito, E. P., Prins, T., van Kan, J. A. (1996). Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Molecular Biology*. 32(5):947-957.

Bhat, R. V., Ramakrishna, Y., Sashidhar, R. B. (1989a). Outbreak of mycotoxicosis in Kashmir Valley. *Nutrition News*. 10(1).

Bhat, R. V., Ramakrishna, Y., Beedu, S. R., Munshi, K. L. (1989b). Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mold-damaged wheat products in Kashmir valley India. *Lancet*. 1(8628):35-37.

Bhat, R. V., Shetty, P. H., Amruth, R. P., Sudershan, R. V. (1997). A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*. 35(3):249-255.

Birzele, B., Prange, A., Krämer, J. (2000). Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Additives and Contaminants*. 17(12):1027-1035.

Böhm-Schraml, M. C., Niessen, L., Donhauser, S., Engelhard, G., Wallnöfer, P. (1993). Medium zur selektiven Abgrenzung von *Fusarium graminearum*. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. 89:152-154.

Böhm-Schraml, M. C. (1995). Fusarienwachstum und Toxinbildung während der Mälzung – Entwicklung von Selektivnährböden zum Nachweis toxinbildender Fusarien. Dissertation. Technische Universität München.

Bourrain, M., Achouak, W. (1999). DNA Extraction from Activated Sludges. *Current Microbiology*. 38(6):315-319.

Bosch, U., Mirocha, C. J. (1992). Toxin production by *Fusarium* species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(10):3233-3239.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichoides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*. 32:121-133.

Buglova, T. T., Skorobogat'ko, O. V., Zakharova, I. I. (1983). Characteristics of purified preparations of galactose oxidase from *Fusarium graminearum*. *Mikrobiologii Zhurnal (Kiev)*. 45:47-52.

Bullerman, L. B. (1995). Occurrence of *fusarium* and fumonisins in food grains in foods. In: Jackson, L., deVries, J. W., Bullerman, L. B. (eds.). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington DC, pp. 419-434.

Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods*. 23(1):89-103.

Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20(9):2380.

Chelkowski, J. (Ed.) (1989). *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam.

Chu, F. S. (1991). Trichothecene mycotoxicosis. In: Dulbecco, R. (Ed.). *Encyclopedia of Human Biology*, vol. 7. Academic Press, New York, pp. 659-669.

Colvin, B. M., Harrison, L. R. (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema hydrothorax in swine. *Mycopathologica*. 117:79-82.

de Nijs, M., Rombouts, F. M., Notermans, S. H. W. (1996). *Fusarium* molds and their mycotoxins. *Journal of Food Safety*. 16:15-58.

Desjardins, A. E., Hohn, T. M. (1997). Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *Molecular Plant - Microbe Interaction*. 10(2):147-152.

Desjardins, A. E., Hohn, T. M., McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol Reviews*. 57(3):595-604.

Desjardins, A. E., Plattner, R. D. (2000). Fumonisin B(1)-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48(11):5773-5780.

Diaz, G. J., Boermans, H. J. (1994). Fumonisin toxicosis in domestic animals: A review. *Veterinary and Human Toxicology*. 36:548-555.

Donaldson, G. C., Ball, A., Axelrood, P. E., Glass, N. L. (1995). Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifers. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4):1331-1340.

Donhauser, S., Weideneder, A., Winnewisser, W., Geiger, E. (1990). Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier. *Brauwelt*. 32:1317-1320.

Doohan, W., Parry, D. W., Nicholson, P. (1999). *Fusarium* ear blight of wheat: the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathology*. 48(2):209-217.

Doyle, R. W., Marth, E. H. (1978). Aflatoxin is degraded at different temperatures and pH values by mycelia of *Aspergillus parasiticus*. *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*. 6:95-100.

Doohan, W., Rezanoor, H. N., Parry, D. W., Nicholson, P. (1999). Development and Use of a Reverse Transcription-PCR Assay To Study Expression of Tri5 by *Fusarium* Species In Vitro and In Planta. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:3850-3854.

Edwards, M. C., Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR - advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications*. 3(4):65-75.

Edwards, S. G., Pirgozliev, S. R., Hare, M. C., Jenkinson, P. (2001). Quantification of Trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine efficacies of fungicides against fusarium head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1575-1580.

EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, OPINION ON FUSARIUM TOXINS. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, Nivalenol and Deoxynivalenol (adopted on 26 February 2002).

EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, OPINION ON FUSARIUM TOXINS Part 1: Deoxynivalenol (DON). (1999).

Freeman, G. G., Morrison, R. I. (1949). The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *Journal of Biochemistry*. 44:1.

Gelderblom, W. C. A., Semple, E., Farber, E. (1992). The cancer initiating potential of the fumonisin mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis*. 13:433–437.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valchx, D., Decallone, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 25:386-401.

Gjertsen, P. (1967). Gushing in beer: its nature, cause and prevention. *The Brewers' Digest*. 42(5):80-84.

Gjertsen, P., Trolle, B., Anderson, K. (1965). Studies on gushing caused by microorganisms, specially *Fusarium* spec. *European Brewery Convention – Proceedings of the 10th Congress, Stockholm*. 428-438.

Glass, N. L., Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(4):1323-1330.

Greenhalgh, R., Levandier, D., Adams, W., Miller, J. D., Blackwell, B. A., McAlees, A. J., Taylor, A. (1986). Production and characterisation of deoxynivalenol and other secondary metabolites of *F. culmorum* (CMI 14764; HLX 1503). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34:98-102.

Guarro, J., Gene, J. (1995). Opportunistic fusarial infections in humans. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 14(9):741-754.

Halford, W. P., Falco, V. C. (1999). The Inherent Quantitative Capacity of the Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*. 266(2):181-191.

Harris, L. J., Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J. C., Weston, G. (1999). Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. *Plant Disease Reporter*. 83(10):954-960.

Hasseltine, C.W., Mehlman (eds.). (1978). *Mycotoxins*. In: Human and Animal Health. Pathotox, Parck Forest South, IL.

Haugland, J. L., Heckman, J. L., Wymer, L. J. (1999). Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 37(2):165-176.

Heller, M. J., Robinson, R. A., Burgart, L. J., TenEyck, C. J., Wilke, W. W. (1992). DNA extraction by sonication: a comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain reaction assays. *Modern Pathology*. 5(2):203-206.

Hernández, M. C., Sacher, B., Back, W. (2000). Untersuchungen zur *Fusarium*-Problematik bei Brauweizen. *Brauwelt*. 35:1385-1392.

Hippeli, S., Elstner, E. F. (2002). Are Hydrophobins and/or Non-Specific Lipid Transfer Proteins responsible for Gushing in Beer? New Hypotheses on the Chemical Nature of Gushing Inducing Factors. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c:1-8.

Hohn, T. M., Beremand, P. D. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene*. 79(1):131-138.

Hohn, T. M., McCormick, S. P., Desjardins, A. E. (1993). Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichoides*. *Current Genetics*. 24:291-295.

Hohn, T. M., McCormick, S. P., Desjardins, A. E. (1999). Characterization of a Transcriptional Activator Controlling Trichothecene Toxin Biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*. 26:224-235.

Homdork, S., Fehrmann, H., Beck, R. (2000). Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. *Journal of Phytopathology*. 148(1):7-15.

Hsu, I. C., Smalley, E. B., Strong, F. M., Ribelin, W. E. (1972). Identification of T-2 Toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Applied Microbiology*. 24:684.

Hue, F.-X., Huerre, M. (1999). Specific Detection of *Fusarium* Species in Blood and Tissues by a PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:2434-2438.

Hwang, S. F., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Ghang, K. F., Howard, R. J., Thomas, A. G. (2000). Effect of temperature, seeding date, fungicide seed treatment and inoculation with *Fusarium avenaceum* on seedling survival, root rot severity and yield of lentil. *Canadian Journal of Plant Science*. 80(4): 899-907.

Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., Ueno, Y. (1983). Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(6):1364-1369.

Ichiyama, S, Ito, Y. (1997). Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(12):3082-3085.

Jaeger, E. E. A., Carroll, N. M., Choudhury, S., Dunlop, A. A. S., Towler, H. M. A., Matheson, M. M., Adamson, P., Okhravi, N., Lightman, S. (2000). Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(8):2902-2908.

Jelinek, C. F., Pohland, A. E. Wood, G. E. (1989). Review of mycotoxin contamination: Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update. *Journal of the Association of Analytical Chemists*. 72:223-230.

John, M. E. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Research*. 20(9):2381.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluations of specific mycotoxins (Aflatoxin M1, Fumonisin, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins). Summary and conclusions. Fifty-sixth meeting Geneva, 6-15 February 2001.

Karch, H., Schwarzkopf, A., Schmidt, H. (1995). Amplification methods in diagnostic bacteriology. *Journal of Microbiological Methods*. 23(1):55-73.

Keller, N. P., Hohn, T. M. (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 21:17-29.

Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1998). Trichothecene 3-O-Acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. *Journal of Biological Chemistry*. 273(3):1654-1661.

Kimura, M., Matsumoto, G., Shingu, Y., Yonekawa, T., Yamaguchi, I. (1998). The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase. Analysis of the region around Tri101 and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichoides*. *Federation of European Biochemical Letters*. 435:163-168.

- Kimura, M., Shingu, Y., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1998). Features of Tri101, the trichothecene 3-O-Acetyltransferase Gene, related to the self-defense mechanism in *Fusarium graminearum*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 62(5):1033-1036.
- Kitabatake, K. (1978). A wort component responsible for gushing in beer. *Bulletin of Brewing Science*. 24:21-32.
- Kleemola, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Kotaviita, E., Olku, J., Haikara, A. (2001). Characterization and detection of the gushing factors produced by fungi. *European Brewery Convention – Proceedings of the 28th Congress, Budapest*. 129-138.
- Klepp, J. (2000). DNA Detection Test StripTM for rapid detection of digoxigenin- or biotin-labeled PCR products. *Roche Molecular Biochemicals – Biochemica*. 2:14-16.
- Klüber, S., Supali, T., Williams, S. A., Liebau, E., Fischer, P. (2001). Rapid PCR-based detection of *Brugia malayi* DNA from blood spots by DNA Detection Test StripsTM. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 95:169-170.
- Knoll, S., Vogel, R. F., Niessen, L. (2002). Identification of *Fusarium graminearum* in cereal samples by DNA Detection Test StripsTM. *Letters in Applied Microbiology*. 34:144-148.
- Koonjul, P. K., Brandt, W. F. (1999). Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA (M). *Nucleic Acids Research*. 27(3):915-916.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. and Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 7:253-306.
- Lamar, R. T., Schoenike, B., Vanden Wymelenberg, A, Stewart, P., Dietrich, D. M., Cullen, D. (1995). Quantification of fungal mRNAs in complex substrates by Reverse Transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(6):2122-2126.

Lauren, D. R., Smith, W. A. (2001). Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives and Contaminants*. 18(11):1011-1016.

Lee, T., Han, Y.-K., Kim, K.-H., Yu, S. H. und Lee, Y.-W. (2002). Tri13 and Tri7 determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2148-2154.

Lee, T., Oh, D.-W., Kim, H.-S., Lee, J., Kim, Y.-H, Yun, S.-H., Lee, Y.-W. (2001). Identification of Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7):2966-2972.

Little, M. C., Andrews, J., Moore, R., Bustos, S., Jones, L., Embres, C., Durmowicz, G., Harris, J., Berger, D., Yanson, K., Rostkowski, C., Yursis, D., Price, J., Fort, T., Walters, A., Collis, M., Llorin, O., Wood, J., Failing, F., O'Keefe, C., Scrivens, B., Pope, B., Hansen, T., Marino, K., Williams, K., Boenisch, M. (1999). Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbe TecET. *Clinical Chemistry*. 45:6 Pt 1 777-784.

Löffler, J., Hebart, H., Schumacher, U, Reitze, H., Einsele, H. (1997). Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(12):3311-3312.

Lu, Y. Y., Ye, S. Y., Hong, G. F. (1991). Large fragment of DNA polymerase I from *Bacillus stearothermophilus* (Bst polymerase) is stable at ambient temperature. *BioTechniques*. 11(4):464-466.

Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., Tousson, T. A. (1984). *Toxigenic Fusarium species: Identity and Mycotoxicology*. University Park, PA: Pennsylvania State University Press.

Marasas, W. F. O., (1996). Fumonisin: history, world-wide impact occurrence and impact. In: Jackson, L., DeVries, J. W., Bullerman, L. B., (eds.), *Fumonisin in Food, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Plenum Press, NY. 392:1-17.

Martins, M. L., Martins, H. M. (2001). Determination of Deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal. *Journal of Food Protection*. 64(11):1848-1850.

Mateo, J. J., Mateo, R., Jimenez, M. (2002). Accumulation of type A trichothecenes in maize and rice by *Fusarium sporotrichoides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 71:115-123.

Matsumoto, G., Wuchiyama, J., Shingu, Y., Kimura, M., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1999). The trichothecene biosynthesis regulatory gene from the type B producer *Fusarium* strain: Sequence of Tri6 and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 63(11):2001-2004.

McCormick, S. P., Hohn, T. M., Desjardins, A. E. (1996). Isolation and characterization of Tri3, a gene encoding 15-O-Acetyltransferase from *Fusarium sporotrichoides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2):353-359.

McCormick, S. P., Hohn, T. M., Desjardins, A. E. (1997). Accumulation of Trichothecenes in Liquid Cultures of a *Fusarium sporotrichoides* Mutant Lacking a Functional Trichothecene C-15 Hydroxylase. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(5):1685-1688.

McCormick, S. P., Alexander, N. J. (2002). *Fusarium* Tri8 encodes a Trichothecene C-3 Esterase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6):2959-2964.

Merril, Jr. A. H., van Echten, G., Wang, E., Sandhoff, K. (1993). Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphiganine) N-acetyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *Journal of Biological Chemistry*. 268:27299-27306.

Milla, M. A., Spears, P. A., Walker, G. T. (1998). Use of the restriction enzyme AVA I and Exo- Bst polymerase in strand displacement amplification. *BioTechniques*. 24:392-396.

Miller, J. D. (1995). Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. *Journal of Stored Product Research*. 31(1):1-16.

Miller, J. D., Taylor, A. und Greenhalgh, R. (1983). Production of deoxynivalenol and related components in liquid culture by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Microbiology. 29:1171-1178.

Miller, J. D., Trenholm, H. L. (1994). Mycotoxins in Grains: Compounds other than aflatoxins. Eagan Press, St. Paul, MN.

Misra, R. S., Sinha, K. K. (1979). Rice flour liquid medium: A new medium to study the aflatoxin producing potential of *Aspergillus flavus*. Letters of the National Academy of Sciences. 2:87-88.

Molto, G., Samar, M. M., Resnik, S., Martinez, E. J., Pacin, A. (2000). Occurrence of Trichothecenes in argentinean beer: a preliminary exposure assessment. Food Additives and Contaminants. 17(9):809-813.

Moss, M. O., Smith, J. E. (1985). Mycotoxins. Wiley, Toronto.

Mulfinger, S., Niessen, L., Vogel, R. F. (2000). PCR based quality control of toxigenic *Fusarium* spp. in brewing malt using ultrasonication for rapid sample preparation. Advances in Food Sciences. 22(1/2)8-46.

Musser, S. M. (1996). Quantification and identification of fumonisins by liquid chromatography/mass spectrometry. In: Jackson, L., deVries, J. W., Bullerman, L. B. (eds.). Fumonisin in Food. Advances in Experimental Medicine and Biology. Plenum Press. 392:65-74.

Muthomi, J. W., Schütze, A., Dehne, H. W., Mutitu, E. W., Oerke, E.-C. (2000). Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 107(2):113-123.

Nadeau, J. G., Pitner, J. B., Linn, C. P., Schram, J. L., Dean, C. H., Nycz, C. M. (1999). Real-Time, Sequence-Specific Detection of Nucleic Acids during Strand Displacement Amplification. Analytical Biochemistry. 276:177-187.

Nelson, P. E., Desjardins, A. E. and Plattner, R. D. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. Annual Review of Phytopathology. 31:233-252.

Nicholson, P. (2001). Molecular Assays as aids in the detection, diagnosis and quantification of *Fusarium* species in plants. In: *Fusarium*- Paul Nelson Memorial Symposium. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (eds.). APS Press, Minnesota.

Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology. 53:17-37.

Niessen, L., Donhauser, S., Weideneder, A., Geiger, E., Vogel, H. (1991). Möglichkeiten einer verbesserten visuellen Beurteilung des mikrobiologischen Status von Malzen. Brauwelt 37:1556-1562.

Niessen, L., Klusmann, J., Vogel, R. F. (1998). Quantitative estimation of *Fusarium graminearum* DNA using a solid phase PCR assay (DIAPOPS). Journal of Food Mycology. 1(2):73-84.

Niessen, L., Vogel, R. F. (1997). Specific identification of *Fusarium graminearum* by PCR with *gaoA* targeted primers. Systematic and Applied Microbiology. 20:111-112.

Niessen, L., Vogel, R. F. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. Systematic Applied Microbiology. 21:618-631.

Nirenberg, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Canadian Journal of Botany. 59:1599-1609.

Nycz, C. M., Dean, C. H., Haaland, P. D., Spargo, C. A., Walker, G. T. (1998). Quantitative Reverse Transcription Strand Displacement Amplification: Quantitation of Nucleic Acids

using an Isothermal Amplification Technique. *Analytical Biochemistry*. 259:226-234.

Odhav, B., Naicker, V. (2002). Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Additives and Contaminants*. 19(1):55-61.

Oswailer, G. D. (2001). Mycotoxins. *Toxicology*. 17(3):547-566.

Park, J. W., Kim, E. K., Shon, D. H., Kim, Y. B. (2002). Occurrence of zearalenone in Korean barley and corn foods. *Food Additives and Contaminants*. 19(2):158-162.

Parry, D., Nicholson, P. (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*. 45:383-391.

Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology*. 44:207-238.

Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., Mrotby, E. (1996). Survey of ethnic foods for mycotoxin. *Food Additives and Contaminants*. 13:833-841.

Paulitz, T. C. (1999): *Fusarium* head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection*. 80:(2) 127-133.

Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* . 77:754-766.

Pestka, J. J., Bondy, G. S. (1990) Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 68(7):1009-1016.

Prediger, E. A. (2001). Quantitating mRNAs with relative and competitive RT-PCR. *Methods in Molecular Biology*. 160: 49-63.

Prelusky, D. B., Rotter, B. A., Rotter, R. G. (1994). Toxicology of mycotoxins. In: *Mycotoxins in Grain* (Edited by Miller, J. D. and Trenholm, H. L.) pp. 359-404. Eagan Press, St.Paul, MN.

Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant - Microbe Interactions*. 8(4):593-601.

Raeder, U., Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1:17-20.

Riley, R. T., Wang, E., Schroeder, J. J., Plattner, R. D., Abbas, H., Yoo, H. S., Merrill, Jr. A. H. (1996). Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Natural Toxins*. 4:3-15.

Rotter, B. A., Prelusky, D. B. (1996): Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 48, 1-34.

Ryu, D., Bullerman, L. B. (1999). Effect of cycling temperatures on the production of Deoxynivalenol and Zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection*. 62(12):1451-1455.

Saenz de Rodriguez, C. A. (1984). Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *New England Journal of Medicine*. 310(26):1741-1742.

Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, R. T., Mullis, K. B., Ehrlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-91.

Sampling for Mycotoxin Analysis - EP/7101-92-02 - Joint FAO/UNEP Project on Training Network for Mycotoxin Control in Asia.

Schilling, A. G., Möller, E. M., Geiger, H. H. (1996). Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology*. 86: 515-522.

Schnerr, H., Niessen, L., Vogel, R. F. (2001). Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™ –PCR using Sybr® Green I for continuous fluorescence monitoring. *International Journal of Food Microbiology*. 71:53-61.

Schnerr, H., Vogel, R. F., Niessen, L. (2002). Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. *Letters in Applied Microbiology*. 35(2):121-125.

Schollenberger, M., Jara, H.T., Suchy, S., Drochner, W., Müller, H.-M.. (2002). *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *International Journal of Food Microbiology*. 72:85-89.

Schollenberger, M., Suchy, S., Jara, H., Drochner, W., Müller, H.-M. (1999). A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in area of southwest Germany. *Mycopathologia*. 147:49-57.

Schuster, M., Lepschy, J., Biber, A., Engelhardt, G., Wallnöfer, P.R. (1987). Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*. 185:477-480.

Schwarz, P. B., Schwarz, J. G., Zhou, A., Prom, L. K., Steffenson, B. J. (2001). Effect of *Fusarium graminearum* and *F. poae* infection on barley and malt quality. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*. 3/4:55-63.

Seo-Jong, A. H., Kim, J.-C., Lee, Y. W., Seo, J. A., Lee, Y. W. (1996). Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*. 59:1003-1005.

Shifrin, V. I., Anderson, P. (1999). Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 274(20):13985-13992.

Smith, J. E., Lewis, C. W., Anderson, J. G., Solomons, G. L. (1994). Mycotoxins. In: Human Health Report EUR 16048 EN. European Commission, Directorate-General XII, Brussels.

Smoragiewicz, W., Cossette, B., Boutard, A., Krzystyniak, K. (1993). Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office buildings. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 65(2):113-117.

Spargo, C. A., Fraiser, M. S., Van Cleve, M., Wright, R., Nycz, C. M., Spears, P. A., Walker, G., T. (1996). Detection of *M. tuberculosis* DNA using Thermophilic Strand Displacement Amplification. *Molecular and Cellular Probes*. 10:247-256.

Spears, P. A., Linn, C. P., Woodard, D. L., Walker, G. T. (1997). Simultaneous Strand Displacement Amplification and Fluorescence Polarization Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA. *Analytical Biochemistry*. 247:130-137.

Stettner, G. (2001). Nachweis und Verhalten von Deoxynivalenol und Ochratoxin A während der Bierbereitung. Dissertation. Technische Universität München.

Su, X., Gibor, A. (1988). A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Analytical Biochemistry*. 174(2):650-657.

Sutton, J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 4:195-209.

Sweeney, M., Dobson, A. D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*. 43:141-158.

Tag, A. G., Garifullina, G. F., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D. Hohn, T. M., Beremand, M. N. (2001). A novel regulatory gene, Tri 10, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11):5294-5302.

Tang, Y., Persing, D. H. (1997). Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry*. 43 (11): 2021-2038.

- Trapp, S. C, Hohn, T. M., McCormick, S., Jarvis, B. B. (1998). Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. *Molecular and General Genetics*. 257:421-432.
- Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S. D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C., Yu, S.,Z. (1997). Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food and Chemical Toxicology*. 35:1143-1150.
- Ueno, Y. (1987). Trichothecenes in food. In: *Mycotoxins in food*, ed. P. Krogh, 123-147.
- Ueno, Y. (1980). Trichothecene mycotoxins: mycology, chemistry and toxicology. *Advances in Nutrition Research*. 3:301-353.
- van Burik, J. A. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*. 36(5):299-303.
- Vanne, L., Haikara, A. (2001). Mycotoxins in total chain from barley to beer. *European Brewery Convention – Proceedings of the 28th Congress, Budapest*.
- Visconti, A., Mirocha, C. J., Bottalico, A., Chelkowsky, J. (1985). Trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium sporotrichoides* strain P-11. *Mycotoxin Research*. 1:3-10.
- Walker, G. T. (1993). Empirical aspects of strand displacement amplification. *PCR Methods and Applications*. 3:1-6.
- Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., Malinkowski, D. P. (1992). Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*. 20(7):1691-1696.
- Webley, D. J., Jackson, K. L., Mullins, J. D. (1997). Mycotoxins in food: a review of recent analyses. *Food Australia*. 49:375-379.

Whitaker, T. B., Hagler, W. M. Jr, Giesbrecht, F. G., Johansson, A. S. (2000). Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for Deoxynivalenol. *Journal of AOAC International*. 83(5):1285-1291.

Wilson, I. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3741–3751.

Wittwer, C. T., Fillmore, G. C., Garling, D. J. (1990). Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*. 186:328-331.

Wittwer, C. T., Fillmore, G. C., Hillyard, D. R. (1989). Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Research*. 17(11):4353-4357.

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., Elenitoba-Johnson, K.S. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. 25(4):430-442.

Wolf, C. E., Bullerman, L. (1998). Heat and pH alter the concentration of Deoxynivalenol in an aqueous environment. *Journal of Food Protection*. 61(3):365-367.

Wong, L. S. C., Abramson, D., Tekauz, A., Leisle, D., McKenzie, R. I. H. (1994). Pathogenicity and mycotoxin production of *Fusarium* species causing head blight in wheat cultivars varying in resistance. *Canadian Journal of Plant Science*. 261-267.

Wuchiyama, J., Kimura, M., Yamaguchi, I. (2000). A trichothecene efflux pump encoded by Tri102 in the biosynthetic gene cluster of *Fusarium graminearum*. *Journal of Antibiotics*. 53: (2):196-200.

Yagen, B., Joffe, A. Z. (1976). Screening of toxic isolates of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichoides* involves in causing alimentary toxic aleukia. *Applied and Environmental Microbiology*. 32:432-427.

Yoder, W. T., Christianson, L. M. (1998). Species-Specific Primers Resolve Members of Section *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*. 23,68-80.

Yoshizawa, T. (1983). Red-mold diseases and natural occurrence in Japan. pp.195-209 in: Dev. Food Sci. 4. Trichothecenes -Chemical, Biological and Toxicological Aspects, Y. Ueno, ed. Kodansha Ltd., Tokyo, Japan.

Yoshizawa, T., Morooka, N. (1973). Deoxynivalenol and its monoacetate: New mycotoxins from *Fusarium roseum* and molded barley. Agricultural and Biological Chemistry. 37:2933.

Zamir, L. O., Devor, K. A., Sauriol, F. (1991). Biosynthesis of the trichothecene 3-Acetyldeoxynivalenol. Biological Chemistry. 266(23):14992-15000.

Zamir, L. O., Nikolakakis, A., Huang, L., St-Pierre, P., Sauriol, F., Sparace, S., Mamer, O. (1999) Biosynthesis of 3-Acetyldeoxynivalenol and Sambucinol. Journal of Biological Chemistry 274(18):12269-12277.

Danke an alle !!!

In den drei Jahren meiner Doktorarbeit haben mich viele Menschen unterstützt und ich kann mich nur herzlich dafür bedanken und hoffe, dass ich ihnen auch eine Hilfe und Freude sein konnte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R.F. Vogel bedanken, der es mir ermöglichte, diese Arbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie durchführen zu können. Danke für das Vertrauen und die Unterstützung.

Vielen Dank an Dr. Ludwig Niessen für das freundschaftliche Verhältnis und die Koordination des Projektes.

Danke schön an alle, die uns Probenmaterial zur Verfügung gestellt haben, die mit uns diskutiert haben und Anregungen für die Arbeit gegeben haben.

Ganz besonderen Dank an die fleißigen Hände im Labor: Claudine Seeliger, Monika Hadek, Georg Meier und Sabine Faulhammer, die den Laboralltag für alle am Laufen halten.

Danke Claudine für die große Hilfe bei der Routinearbeit. Es hat großen Spaß gemacht, mit dir zu arbeiten und ich konnte mich immer auf dich verlassen.

Vielen Dank Angela, meine Lieblingssekretärin und die beste der Welt. Was wäre jeder Morgen gewesen ohne dein freundliches Lachen. Danke für deine Freundschaft!

Danke an alle anderen Kollegen, die das Arbeitsklima so schön machten: Adriana, Andreas (Stocki), Anita, Carsten, Claudia, Christian L., Dirk, Ellen, Helge U., Holger, Maher, Matthias, Marco, Markus, Martin, Michael, Rüdiger, Ruth und alle anderen.

Danke an alle Freunde für die schönen Stunden: Angela, Adriana, Erik, Uli, Sybille, Helge Fritsch, Matze, Markus B., Natalie, Ersan, Claudine, Stephan, Claudia, Philipp, Ellen ...

Lieber Georg, das Beste, was mir hier passiert ist, bist DU!!! Danke!

Vielen Dank an meine liebe Schwester Ruth einfach dafür, dass sie da ist.

Vielen Dank an meinen lieben Bruder Hardy für alles, Computerunterstützung, Musiklieferungen usw. usw.

Meine größte Dankbarkeit lässt sich nicht in Worte fassen.

Danke an meine Eltern, die meine Ausbildung immer unterstützt haben und mir alle Freiheiten gelassen haben.

Ohne euch hätte ich das nicht geschafft. Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten	Name:	Alexandra Knoll
	Geburtstag:	23.07.1974
	Geburtsort:	Biberach an der Riss
	Familienstand:	ledig
Schulausbildung	08/80 - 07/84	Freiherr - von - Stein - Grundschule Ostrach
	08/84 - 07/87	Realschule Ostrach
	08/87 - 05/93	Gymnasium Wilhelmsdorf, Abitur, Note: 1,2
Studium	10/93 - 01/99	Studium der Biologie an der Universität Konstanz Studienabschluß als <u>Diplom - Biologin</u> Note: sehr gut
	10/99 - 09/01	Aufbaustudiengang Biotechnologie, TU München
Promotion	07/99 – 07/02	Wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Freising-Weihenstephan
Praktika/Fortbildung	07/96 - 09/96	Praktikum Quellenkartierung, Umweltzentrum Stockach
	12/01	Fortbildung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit nach § 15 GENTSV