

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

# Molekularbiologische Quantifizierung von Schimmelpilzbesatz an Saatgut und Braumalz

Michael Dahmen

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven  
2. apl. Prof. Dr. M. L. Niessen

Die Dissertation wurde am 26.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.01.2012 angenommen.

**Gewidmet meiner Familie**

---

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Summary .....   | 2         |
| <b>2</b> | <b>Einleitung .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1      | Problemstellung und Zielsetzung .....                                     | 4         |
| 2.1.1    | Allgemeine Betrachtung .....  | 4         |
| 2.1.2    | Schimmelpilze bei der Aufbereitung von Zuckerrübensaatgut.....            | 5         |
| 2.1.3    | Schimmelpilze auf Braugetreide und Malz .....                             | 7         |
| 2.2      | Stand des Wissens .....   | 11        |
| 2.2.1    | DNA-Isolierungsverfahren .....  | 11        |
| 2.2.2    | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....                                     | 13        |
| 2.2.2.1  | Grundprinzip der PCR .....  | 13        |
| 2.2.2.2  | Real-Time PCR.....  | 13        |
| 2.2.2.3  | Real-Time Multiplex PCR .....   | 17        |
| 2.2.3    | Auswahl von Primer und Sonde .....  | 19        |
| 2.2.3.1  | Allgemeine Parameter .....  | 19        |
| 2.2.3.2  | Molekularbiologische Parameter.....                                       | 20        |
| 2.2.3.3  | Technische Parameter.....   | 22        |
| 2.2.4    | PCR-Nachweis von <i>Alternaria alternata</i> und <i>Phoma betae</i> ..... | 22        |
| 2.2.5    | PCR-Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies.....                             | 23        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden .....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1      | Material .....  | 26        |
| 3.1.1    | Geräte .....  | 26        |
| 3.1.2    | Reagenzien und Kits .....   | 27        |
| 3.1.3    | Verbrauchsmaterialien .....   | 28        |
| 3.1.4    | Puffer.....   | 29        |
| 3.1.5    | Software .....  | 29        |
| 3.1.6    | Oligonukleotide.....  | 29        |
| 3.1.7    | Nährmedien.....   | 30        |
| 3.1.8    | Pflanzen .....  | 30        |
| 3.1.9    | Mikroorganismen.....  | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2 Methoden .....  | 32        |
| 3.2.1 Anzucht und Stammhaltung .....  | 32        |
| 3.2.1.1 Mikroorganismen .....   | 32        |
| 3.2.1.2 Pflanzen.....   | 32        |
| 3.2.2 DNA-Präparationsverfahren aus Stammkulturen .....                             | 32        |
| 3.2.2.1 Schimmelpilze.....  | 32        |
| 3.2.2.2 Pflanzen.....   | 33        |
| 3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA .....                           | 33        |
| 3.2.3 Sequenzierung von PCR-Produkten .....   | 33        |
| 3.2.3.1 Herstellung von PCR-Produkten.....  | 33        |
| 3.2.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten.....   | 34        |
| 3.2.3.3 Sequenzierung und Auswertung der Daten .....                                | 34        |
| 3.2.4 Temperaturprofile Real-Time PCR .....   | 35        |
| 3.2.5 Bestimmung des DON-Gehalts .....  | 36        |
| 3.2.6 Bestimmung der Gushing Neigung des Malzes.....                                | 36        |
| <b>4 Entwicklung und Evaluierung von PCR-Systemen.....</b>                          | <b>37</b> |
| 4.1 Strategie zur Entwicklung des Real-Time Multiplex PCR Assays .....              | 37        |
| 4.2 Quantifizierung von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut .....                      | 38        |
| 4.2.1 Vorstudie .....   | 38        |
| 4.2.2 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe .....                                       | 40        |
| 4.2.3 Kalibrierung des Messgeräts .....   | 41        |
| 4.2.4 Auswahl der Primer und Sonden.....  | 41        |
| 4.2.5 Validierung des Real-Time Multiplex PCR Assays für Zuckerrübenschädlinge..... | 43        |
| 4.2.5.1 Kontrolle der Primer zur Detektion des Referenzgens aus Zuckerrübe .....    | 43        |
| 4.2.5.2 Kontrolle der Primer zur Detektion der Zuckerrüben-Pathogene .....          | 45        |
| 4.2.5.3 Ermittlung der Standardkurven .....   | 50        |
| 4.2.5.4 Kreuzreaktionstest des PCR Assays für Zuckerrüben-Pathogene .....           | 54        |
| 4.2.6 Ergebnisse der Validierung .....  | 55        |
| 4.2.6.1 Linearität und Effizienz des Real-Time Multiplex Assays.....                | 55        |
| 4.2.6.2 Nachweisgrenzen .....   | 56        |
| 4.2.6.3 Kreuzreaktionen.....  | 56        |
| 4.2.7 Berechnung der Belastungsindizes für Zuckerrüben-Pathogene .....              | 57        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3      | Quantifizierung von <i>Fusarium</i> Spezies an Braumalz .....                 | 58        |
| 4.3.1    | Beschreibung des verwendeten Real-Time Multiplex PCR-Systems .....            | 58        |
| 4.3.2    | Validierung des Real-Time Multiplex PCR Assays .....                          | 60        |
| 4.3.2.1  | Ermittlung der Standardkurven .....   | 60        |
| 4.3.2.2  | Kreuzreaktionstest .....  | 65        |
| 4.3.3    | Ergebnisse der Validierung .....  | 67        |
| 4.3.3.1  | Linearität und Effizienz des Real-Time Multiplex PCR Assays .....             | 67        |
| 4.3.3.2  | Nachweisgrenzen .....   | 68        |
| 4.3.3.3  | Kreuzreaktionen.....  | 68        |
| 4.3.4    | Berechnung der Belastungsindizes .....  | 69        |
| 4.4      | Optimierung der Real-Time Multiplex PCR-Reaktionen .....                      | 70        |
| 4.4.1    | Reaktionskomponenten des PCR-Ansatzes .....                                   | 70        |
| 4.4.1.1  | Versuch 1: Test verschiedener Reaktionskomponenten im PCR-Ansatz .....        | 70        |
| 4.4.1.2  | Versuch 2: Variation verschiedener Reaktionskomponenten .....                 | 74        |
| 4.4.1.3  | Schlussfolgerungen aus Versuch 1 und Versuch 2 .....                          | 76        |
| 4.4.1.4  | Versuch 3: Validierung des optimierten Reaktionsmixes .....                   | 76        |
| 4.4.1.5  | Schlussfolgerung aus der Optimierung selbst hergestellter PCR Master-Mix..... | 78        |
| 4.4.2    | Vergleich verschiedener kommerzieller Master-Mixe .....                       | 79        |
| 4.4.3    | Primer- und Sondenkonzentration.....  | 80        |
| 4.4.4    | Fluoreszenzmarkierungen.....  | 81        |
| <b>5</b> | <b>Entwicklung und Optimierung der DNA-Isolierungsmethode .....</b>           | <b>83</b> |
| 5.1      | Allgemeiner Aufbau der Versuche.....  | 83        |
| 5.2      | Verwendete Puffer .....   | 86        |
| 5.2.1    | Extraktionspuffer .....   | 86        |
| 5.2.2    | Bindepuffer.....  | 88        |
| 5.2.3    | Waschpuffer .....   | 89        |
| 5.2.4    | Elutionspuffer .....  | 89        |
| 5.3      | Versuchsablauf .....  | 90        |
| 5.3.1    | Probenverarbeitung.....   | 90        |
| 5.3.2    | Analyse von DNA-Isolaten .....  | 91        |
| 5.3.2.1  | Getreideproben.....   | 91        |
| 5.3.2.2  | Zuckerrübensaatgutproben.....   | 92        |
| 5.3.3    | Bewertung der DNA-Extraktion .....  | 92        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 5.4      | Versuchsdurchführung.....   | 93         |
| 5.4.1    | Vergleich verschiedener Extraktionspuffer .....   | 93         |
| 5.4.2    | Vergleich verschiedener Bindepuffer.....  | 95         |
| 5.4.3    | DNA-Isolierung mit optimierten Extraktions- und Bindepuffern.....                         | 97         |
| 5.4.4    | Vergleich unterschiedlicher Spin-Säulchen .....   | 101        |
| 5.5      | Ergebnis der Evaluierung .....  | 104        |
| <b>6</b> | <b>Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben.....</b>                                     | <b>105</b> |
| 6.1      | Aufbau der Versuche .....   | 105        |
| 6.2      | Vorversuche.....  | 106        |
| 6.2.1    | Bestimmung der relativen Standardabweichung der Belastungsindizes .....                   | 106        |
| 6.2.2    | Bestimmung der Korrelationskoeffizienten .....  | 111        |
| 6.2.3    | Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der Vorversuche .....                                | 113        |
| 6.3      | Ergebnisse aus der Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben .....                        | 114        |
| <b>7</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>131</b> |
| 7.1      | Entwicklung und Optimierung neuer PCR-Systeme .....                                       | 131        |
| 7.1.1    | Aufbau der Real-Time Multiplex PCR-Systeme.....   | 131        |
| 7.1.1.1  | Detektion eines Referenzgens aus der zu untersuchenden Pflanze .....                      | 131        |
| 7.1.1.2  | Nachweis von <i>Alternaria</i> Spezies und <i>Phoma betae</i> an Zuckerrübensaatgut ..... | 132        |
| 7.1.1.3  | Nachweis und Differenzierung von <i>Fusarium</i> Spezies an Braumalz.....                 | 134        |
| 7.1.2    | Vergleich der beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme .....                                | 134        |
| 7.1.3    | Optimierung der Real-Time Multiplex PCR-Systeme .....                                     | 137        |
| 7.2      | Entwicklung und Optimierung der DNA-Isolierung.....                                       | 137        |
| 7.3      | Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben.....  | 140        |
| 7.4      | Ausblick.....   | 145        |
| <b>8</b> | <b>Anhang .....</b>   | <b>146</b> |
| 8.1      | Abbildungsverzeichnis .....   | 154        |
| 8.2      | Tabellenverzeichnis .....   | 158        |
| 8.3      | Abkürzungsverzeichnis.....  | 160        |
| 8.4      | Literaturverzeichnis.....   | 162        |

## 1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Real-Time Multiplex PCR Assay zum quantitativen Nachweis von Schimmelpilzen an Pflanzenmaterial entwickelt sowie ein Real-Time Multiplex PCR Assay zum Nachweis von *Fusarium* Spezies an Braumalz validiert. Ein Vorteil der Real-Time Multiplex PCR-Analytik besteht darin, dass mit einem einzelnen PCR-Ansatz drei Informationen pro Probe generiert werden. Die phytopathogenen Schimmelpilze wurden jeweils in Bezug zur Pflanzen-DNA gesetzt und dadurch ein so genannter Belastungsindex berechnet. Mittels dieser Größe konnte der Infektionsgrad verschiedener Proben miteinander verglichen werden.

Zusätzlich wurde ein Isolierungs- und Aufreinigungsverfahren für die DNA des untersuchten Probenmaterials entwickelt. Die Anforderungen dieses Systems wurden jeweils in Zusammenarbeit mit Partnern aus der Industrie formuliert, deren Interesse neben einem spezifischen Nachweissystem auch in der Anwendung der Analytik im hauseigenen Labor lag. Besonders letztgenannte Prämisse wurde in allen Entwicklungsschritten berücksichtigt: Innerhalb von 4,5 Stunden, von der Extraktion bis zur Auswertung, können 48 Proben untersucht werden, wobei die „hands on time“ zwei Stunden beträgt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Bearbeitung von Proben mit dem im Labor bereits vorhandenen Equipment durchgeführt werden kann.

Mit dem ersten spezifischen Nachweissystem konnten die Ascomyceten *Phoma betae* und ausgewählte *Alternaria* Spezies an Zuckerrübensaatgut detektiert werden. In diesem Fall stand die Bestimmung der Befallsdichte im Vordergrund. Für das Partnerunternehmen war von Interesse, mögliche Auswirkung dieser Phytopathogene auf das Keimungsverhalten des Zuckerrübensaatguts zu ermitteln.

Weiterhin wurden *Fusarium* Spezies an Braumalzen analysiert. An dieser Stelle konnte eine Differenzierung zwischen dem Gesamtbesatz an *Fusarium* Spezies und der Gruppe *Fusarium cerealis*, *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* vorgenommen werden, welche in dieser Arbeit auch als die Gruppe der starken Toxinbildner bezeichnet wird. In diesem Rahmen wurden Untersuchungen an insgesamt 273 Praxisproben durchgeführt, wobei es sich um Gersten- und Weizenmalze handelte. Die Real-Time Multiplex PCR-Messwerte wurden anschließend mit dem Gushingverhalten der Malze sowie deren Mykotoxinbelastung verglichen. Dabei wurde beobachtet, dass weder vom Gesamtbesatz an *Fusarium* Spezies noch aus deren

Teilmenge, der Gruppe der „starken Toxinbildner“ ein direkter Zusammenhang zum Phänomen des Gushings hergestellt werden konnte.

Dagegen wurde festgestellt, dass bei einem Belastungsindex der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies  $\geq 1$  die DON-Konzentration dieser Proben über 175 ppb lag. Für ein schnelles Screening von Malzmustern, um potentiell hoch Mykotoxin belastete Chargen zu identifizieren, ist das verwendete Verfahren folglich sehr gut geeignet.

## 1.1 Summary

Within the framework of this thesis, a Real-Time multiplex PCR assays has been developed for the quantitative identification of moulds on plant material. Furthermore a Real-Time multiplex PCR assay for the detection of *Fusarium* species on malt was validated. The advantage of the Real-Time multiplex PCR method was that with one single PCR reaction three different pieces of information were generated per sample. The contaminants were related to the plant DNA, respectively, and thus a so called load index was calculated. By means of this parameter the samples could be compared to each other.

Additionally, an isolation and purification system for the DNA from the examined sample material was developed. Specific requirements and aims of this method were set in cooperation with partners from the respective industry. Their interests were beside a specific identification PCR assay also the use of this analysis in their own laboratories. This purpose was considered in all steps of development: with the new method, 48 samples can be analysed within 4.5 hours from extraction to evaluation wherein the hands on time is 2 hours. It was further well thought-out that the analysis of the sample could be conducted with the equipment already available in those labs.

Examined were the ascomycetes *Phoma betae* and *Alternaria* species on sugar beet seeds. In this context, determination of the amount of infection was the main aspect. For the partner company it was of major interest to detect the potential effects of both phytopathogens on the germination of the sugar beet seeds.

Furthermore, *Fusarium* species on brewing malts were analysed. Here it could be distinguished between the sum of contaminations with *Fusarium* species in total and the three species *Fusarium cerealis*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* which were named “group of high toxin producers” in this thesis.



In this context, extensive examinations of 273 samples in total of barley and wheat were made. The Real-Time multiplex PCR results were subsequently compared with the gushing behaviour of the malt as well as with the mycotoxin content. As a result, it was determined that neither the total infection rate with *Fusarium* species nor with the group of high toxin producers is directly related to the phenomenon of gushing.

As main result, it was determined that with a load index of high toxin producing *Fusarium* species of 1 or higher, the DON concentration per sample was always above 175 ppm. Consequently, the new method is suitable for a fast screening of malt samples in order to identify malt batches which are potentially high contaminated with mycotoxins.

## 2 Einleitung

### 2.1 Problemstellung und Zielsetzung

#### 2.1.1 Allgemeine Betrachtung

Seitdem die Polymerase Kettenreaktion (PCR) Ende des letzten Jahrhunderts Einzug in die Molekularbiologie gehalten hat, besteht die Möglichkeit, unzählige diagnostische Problemstellungen neu zu betrachten. Die Methode findet Anwendung in verschiedenen Forschungsfeldern der Humanmedizin, Veterinärmedizin sowie Forensik und ist aus diesen Bereichen nicht mehr wegzudenken (Cakilci *et al.*, 2006; Whiley *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001a; Evett *et al.*, 1996). Ebenso ist der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen, beispielsweise *Salmonella* Spezies, in Lebensmitteln mittels PCR, bereits heute Stand der Technik und im Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB § 64) verankert. Die vielfachen Anwendungen lassen sich durch die hohe Spezifität und Sensitivität der Methode sowie deren mittlerweile einfache Handhabung begründen.

Eben diese Vorteile machen sich auch Phytopathologen bei der Analyse von viralen Infekten oder mikrobiologischen Kontaminationen an Pflanzen zu Nutze (McCartney *et al.*, 2003). Im Fokus der Untersuchungen stehen dabei insbesondere Kulturpflanzen, deren Schädigung ökonomische Folgen, beispielsweise in Form von Ernteaussfällen haben kann. Weiterhin spielt die Früherkennung von solchen Mikroorganismen eine tragende Rolle, die in der Lage sind, im Laufe der Vegetationsperiode Toxine zu bilden, welche sich im Erntegut anreichern können.

Diesen beiden Fragestellungen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Unter Verwendung von Real-Time Multiplex PCR-Systemen wurde der Besatz von pathogenen Schimmelpilzen an Kulturpflanzen und daraus hergestellten Produkten untersucht. Dabei ging es zum einen um die Früherkennung der beiden Schimmelpilze *Alternaria alternata* und *Phoma betae*, denen bei der Aufbereitung von Zuckerrübensaatgut besondere Beachtung geschenkt wird (Grothaus, 1997). Die Fragestellung lautete hier, welcher Bearbeitungsschritt im Aufbereitungsprozess sich in welcher Weise auf die mengen- und verhältnismäßige Zusammensetzung der beiden Pathogene am Zuckerrübensaatgut auswirkt.

Zum anderen wurden verschiedene *Fusarium* Spezies, welche Braugetreide und die daraus produzierten Malze infizieren können, einer näheren Betrachtung unterzogen. Dazu wurde einerseits der Gesamtbesatz an *Fusarium* Spezies an Gersten- bzw. Weizenmalz gemessen und andererseits eine Differenzierung zwischen potentiell stark und schwach toxinbildenden *Fusarium* Spezies vorgenommen.

Um die erste Fragestellung zu bearbeiten, wurde zunächst ein Real-Time Multiplex PCR Assay entwickelt. Der Nachweis verschiedener *Fusarium* Spezies erfolgte unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Real-Time Multiplex PCR Kits, der im Aufbau dem hier entwickelten Assay ähnlich ist. Beide Assays sollten neben dem spezifischen Nachweis auch die Quantifizierung der Mikroorganismen ermöglichen. Im Anschluss daran sollte eine DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis der oben genannten Mikroorganismen an Zuckerrübensaatgut sowie an Braumalz etabliert werden.

Letztlich wurden mit beiden Real-Time Multiplex PCR-Systemen Praxisproben untersucht. Im Anschluss erfolgte ein Abgleich der molekularbiologischen Daten mit den zur Probe gehörenden verfahrenstechnischen bzw. chemisch-technischen Parametern. Ziel war es, anhand von molekularbiologischen Messwerten eine Empfehlung für die weitere Verarbeitung des analysierten Musters abgeben zu können.

### 2.1.2 Schimmelpilze bei der Aufbereitung von Zuckerrübensaatgut

Laut statistischem Bundesamt wurden in Deutschland im Jahr 2010 auf 365.800 ha Zuckerrüben angebaut, dies entspricht 3,1 % der gesamten Ackerfläche. Dazu verwendet man in Deutschland ausschließlich genetisch einkeimiges, pilliertes Monogermsaatgut, da es neben dem besten Feldaufgang auch den Vorteil des geringsten Arbeitsaufwands beim Anbau aufweist. Die Sortenwahl spielt beim Zuckerrübenanbau eine herausragende Rolle; es gilt neben den ökonomischen Faktoren wie Ertrag, Zuckergehalt und Zuckerreinheit insbesondere die Standortfaktoren zu berücksichtigen (Ziegler, 2006). Letztere können bereits über das Vorkommen potenzieller Schädlinge Aufschluss geben. Dies wird bereits während der Züchtung berücksichtigt, da die Selektion resistenter Sorten fortwährendes Ziel der Saatgutproduzenten ist. Daneben ist laut Stephan (2005) auch eine verbesserte genetische Eigenschaft zur Steigerung des Zuckerertrags von entscheidender Bedeutung.

Bei der Zuckerrübe handelt es sich um eine zweijährige Pflanze. Das heißt, im ersten Jahr bildet sie ihren Rübenkörper, im zweiten Jahr die Samenträger. Die Samenvermehrung findet in Europa hauptsächlich in den klimatisch günstigen Regionen Norditaliens und Südfrankreichs statt, da hier der Infektionsdruck gering und eine möglichst trockene Abreife der Samen möglich ist (Bornscheuer *et al.*, 1993). Die Belastung des Saatguts durch krankheitserregende Keime kann somit reduziert werden. An die Ernte des Saatguts schließt sich der Aufbereitungsprozess an, welcher schematisch in Anlehnung an Bornscheuer *et al.* (1993) in Abbildung 1 dargestellt ist.



Abbildung 1: Aufbereitungsprozess von Zuckerrübensaatgut

Um qualitativ hochwertiges Saatgut zu produzieren, möchte der Hersteller mikrobiologische Kontaminationen in Form von samenbürtigen Schimmelpilzen vermeiden, da deren parasitäre Einflüsse den Feldaufgang negativ beeinflussen würden. Bisher ist lediglich *Phoma betae* als samenbürtiger Keim beschrieben, allerdings bestehen Vermutungen, dass auch *Alternaria alternata* (synonym *Alternaria tenuis*) sich ähnlich keimschädigend verhält, wenn er in hoher Konzentration am Saatgut vorliegt (Kowalik und Lechowicz, 1984; Rotem, 1994; Grothaus, 1997).

Durch die Anwendung des hier entwickelten Real-Time Multiplex PCR-Systems sollte eine genauere Betrachtung des Saatgutaufbereitungsprozesses im Hinblick auf die beiden Schimmelpilze *Alternaria alternata* und *Phoma betae* ermöglicht werden. Zunächst könnte die Menge der Zielkeime am Ausgangssaatgut bestimmt und die Verarbeitungsschritte entsprechend angepasst werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, jeden Aufbereitungsschritt hinsichtlich seiner Wirkungsweise auf die beiden Kontaminanten zu überprüfen. Denkbar ist auch, die Konzentration der in der Hüllmasse befindlichen Fungizide gegen samenbürtige Pilze entsprechend an die tatsächlich am Saatgut vorliegende Keimbelastung anzupassen.

### 2.1.3 Schimmelpilze auf Braugetreide und Malz

Schimmelpilze sind Gegenstand vielfältiger Untersuchungen im Hinblick auf die Qualität von Braugetreide und Malz sowie den daraus hergestellten Bieren. Auf Getreide ist im Allgemeinen eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen nachweisbar. Die Keimbelastung der Pflanze mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen während des Wachstums ist dabei maßgeblich von den klimatischen Bedingungen während der einzelnen Vegetationsperioden, von der geographischen Lage des Anbaugebiets und nicht zuletzt von chemisch-physikalischen Pflanzenschutzmaßnahmen wie Fungizideinsatz und Bodenbearbeitung abhängig (Kunz, 1994). In den folgenden Ausführungen werden aus der Gesamtheit dieser Mikroorganismen die Schimmelpilze bezüglich ihres Vorkommens auf Braugetreide, insbesondere Gerste und Weizen, und dem daraus hergestellten Malz einer genaueren Betrachtung unterzogen.

Auf dem Getreide lassen sich verschiedenartige Schimmelpilze nachweisen, welche grob in die Kategorien Feld- und Lagerpilze eingeteilt werden können. In Abbildung 2 sind ausgewählte Gattungen beider Gruppen dargestellt (Lacey, 1989; Niessen, 1991; Chelkowski, 1991).

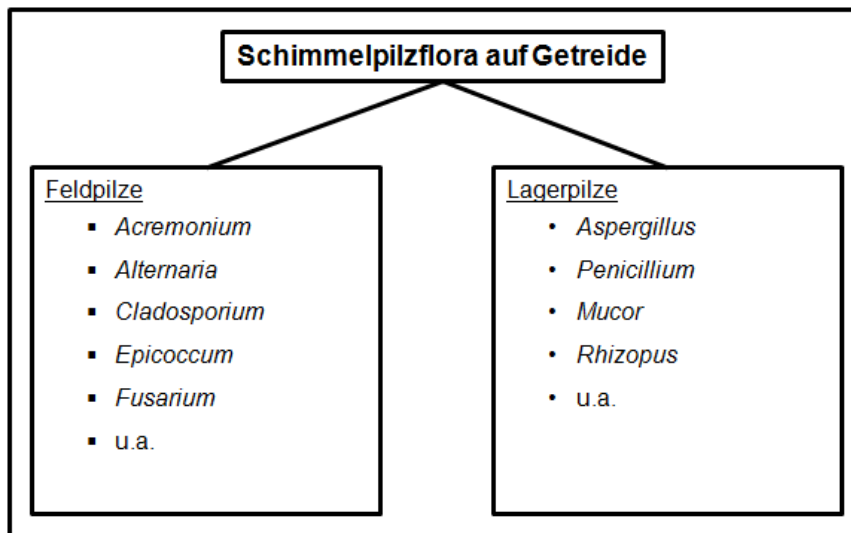


Abbildung 2: Schimmelpilzflora auf Getreide

Die dargestellte Gliederung folgt nicht der Systematik der Pilze, sondern verdeutlicht lediglich den Zeitpunkt, ab welchem mit einem verstärkten Auftreten der einzelnen Gattungen zu rechnen ist. Ebenso wenig bedeutet diese Einteilung, dass sich nicht schon vor der Lagerung des Getreides bestimmte Vertreter der Lagerflora auf dem Korn nachweisen lassen. Die Gruppe der Feldpilze umfasst vornehmlich die Keime, welche das Getreide als samenbürtige Pathogene kontaminieren oder aber das Korn während der Blüte besiedeln. Hingegen treten Lagerpilze vornehmlich bei unsachgemäßer Lagerung des Getreides auf und breiten sich dann rasch über weite Teile der Partie aus (Niessen, 1991, o.V., 2005). Dies lässt sich allerdings durch eine schnelle Absenkung des Wassergehalts des Getreides weitgehend verhindern. Die in Abbildung 2 aufgeführten Gattungen benötigen einen  $a_w > 0,85$  zum Wachstum; eingelagertes Braugetreide liegt mit einem Wassergehalt von ca. 14 % deutlich unter diesem Wert (Lacey, 1989). Folglich ist für die Qualität des Getreides hinsichtlich der Belastung durch Schimmelpilze vornehmlich die Feldflora von Interesse, wobei vor allem Vertreter der Gattung *Fusarium* Gegenstand zahlreicher Untersuchungen sind.

Dies ergibt sich zum einen aus der Tatsache, dass eine *Fusarium* Infektion in Form von Ährenfusariosen zu erheblichen Qualitäts- und Ernteverlusten führen kann (Charmley *et al.*, 1994; Nganje *et al.*, 2004). Zum anderen sind nahezu alle *Fusarium* Spezies in der Lage, verschiedene Mykotoxine zu bilden, die bei Mensch und Tier erhebliche gesundheitliche Beeinträchtigungen hervorrufen können (Rodemann, 1999). An dieser Stelle sind insbesondere die beiden als Leitsubstanzen geltenden Toxine Desoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) zu nennen, deren Grenzwerte in der EU-Verordnung (EG) Nr. 856/2005 geregelt sind.

Von den über 100 bekannten *Fusarium*-Arten treten nach Ausführungen der Forschergruppe um Parry *et al.* (1995) insbesondere 16 verschiedene Spezies als Kontaminanten von Getreide auf. Diese sind in Tabelle 1 mit einer Auswahl der von ihnen gebildeten Toxine aufgeführt (Nierenberg, 1990; ApSimon, 1994; Miller, 1995; Desjardins, 2006). Wurde die Bildung der genannten Toxine nachgewiesen, sind diese mit einem [+] gekennzeichnet, ein negatives Verhalten ist mit einem [-] dargestellt. Sollten sich einzelne Stämme einer Spezies unterschiedlich verhalten, ist dies durch [+/-] zum Ausdruck gebracht. Liegen hingegen keine Angaben vor, so ist dies durch [k. A.] angezeigt.

Tabelle 1: Von Getreide isolierte *Fusarium* Spezies und verschiedene von diesen gebildete Toxine

| <i>Fusarium</i> Spezies    | Synonym                   | Tricho-<br>thecene | Zearale-<br>none | Fumo-<br>nisine | Monili-<br>formin | Fusarine |
|----------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|-----------------|-------------------|----------|
| <i>F. acuminatum</i>       |                           | k.A.               | k.A.             | k.A.            | k.A.              | k.A.     |
| <i>F. avenaceum</i>        |                           | -                  | k.A.             | -               | +                 | +        |
| <i>F. crookwellense</i>    | <i>F. cerealis</i>        | +                  | +                | k.A.            | k.A.              | +        |
| <i>F. culmorum</i>         |                           | +                  | +                | k.A.            | k.A.              | +        |
| <i>F. equiseti</i>         |                           | +                  | +                | -               | +                 | -        |
| <i>F. graminearum</i>      |                           | +                  | +                | -               | -                 | +        |
| <i>F. lateritium</i>       |                           | k.A.               | k.A.             | k.A.            | k.A.              | k.A.     |
| <i>F. moniliforme</i>      | <i>F. verticillioides</i> | k.A.               | k.A.             | +               | +/-               | +        |
| <i>F. oxysporum</i>        |                           | k.A.               | k.A.             | k.A.            | k.A.              | k.A.     |
| <i>F. poae</i>             |                           | +                  | k.A.             | -               | k.A.              | +        |
| <i>F. proliferatum</i>     |                           | k.A.               | k.A.             | k.A.            | k.A.              | k.A.     |
| <i>F. sambucinum</i>       |                           | +                  | -                | -               | k.A.              | +        |
| <i>F. semitectum</i>       | <i>F. incarnatum</i>      | k.A.               | k.A.             | k.A.            | k.A.              | k.A.     |
| <i>F. sporotrichioides</i> |                           | +                  | k.A.             | -               | k.A.              | +        |
| <i>F. subglutinans</i>     |                           | k.A.               | k.A.             | +/-             | +                 | +        |
| <i>F. tricinctum</i>       |                           | -                  | k.A.             | k.A.            | k.A.              | +        |

Eine Infektion des Braugetreides mit *Fusarium* Spezies kann auf die Malz- und Bierherstellung unterschiedliche Auswirkungen haben:

- (1) *Fusarium* Spezies können durch das Ausscheiden von Proteasen die Eiweißzusammensetzung im Getreide verändern und dadurch höhere Eiweißlösungsgrade im Malz hervorrufen. Die Änderung des kolloidalen Gefüges wirkt sich wiederum negativ auf die Schaumstabilität aus (Niessen, 2001; Sarlin *et al.*, 2005a).

- (2) Verschiedene *Fusarium* Toxine können sich auf das Gärverhalten der Hefe auswirken. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass T-2, DON und ZEA die Hefevermehrung in der logarithmischen Phase negativ beeinträchtigen (Flanning *et al.*, 1985; Koshinsky *et al.*, 1992).
- (3) Einige von den *Fusarium* Spezies gebildeten Mykotoxinen, beispielsweise DON, sind wasserlöslich sowie thermisch stabil und überdauern somit teilweise den Brauprozess. In Folge dessen können diese auch im fertigen Bier in nachweisbaren Konzentrationen vorliegen (Hernández *et al.*, 2000).
- (4) Letztlich werden *Fusarium* Spezies in vielfältigen Studien in Zusammenhang mit der Ursache des primären Gushing, dem spontanen Überschäumen des Biers nach Öffnen der Flasche, gesehen. Die genaue Ursache für dieses Phänomen ist bislang jedoch noch nicht abschließend geklärt. Erste Erkenntnisse diesbezüglich waren vornehmlich empirischer Natur; so konnten Zusammenhänge zwischen *Fusarium* Befall am Malz und Gushing des daraus produzierten Bieres beobachtet werden (Weideneder, 1992; Haikara, 1983). In nachfolgenden Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass bestimmte Proteineinheiten der *Fusarium* Spezies am Gushing Effekt beteiligt sind (Kleemola, 2001; Hippeli und Elstner, 2002; Sarlin *et al.*, 2005b; Zapf, 2006).

Um das Risiko technologischer Probleme zu mindern, ist der Brauer daran interessiert, Malzchargen zu verarbeiten, die keine oder aber eine möglichst geringe Belastung mit *Fusarium* Spezies aufweisen. Unter Anwendung des in dieser Arbeit validierten Real-Time Multiplex PCR Assays sollte ein Schwellenwert für einen kritischen Besatz an *Fusarium* Spezies auf Malz ermittelt werden.



## 2.2 Stand des Wissens

### 2.2.1 DNA-Isolierungsverfahren

Recherchiert man in wissenschaftlichen Veröffentlichungen und in Internetdatenbanken zum Thema DNA-Isolierung, so ist festzustellen, dass eine Vielzahl unterschiedlicher kommerzieller und frei verfügbarer Methoden existieren. Entscheidend für die Anwendung einer Isolierungsmethode sind zum einen die Probenmatrix, aus der die DNA isoliert werden soll, und zum anderen der Zielorganismus, der nachgewiesen werden soll.

Häufig kommt eine der unten stehenden Methoden zum Einsatz. Diese lassen sich jeweils grob in vier Schritte gliedern:

1. Zellyse, Waschen, Fällern und Resuspendieren der DNA, oder
2. Zellyse, Binden der DNA an eine Silika-Membran, Waschen und Elution der DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde eine DNA-Isolierungsmethode für Schimmelpilze von Zuckerrübensaatgut und Braumalz entwickelt, die auf der DNA-Bindung an eine Silika-Membran beruht. Daher soll lediglich diese Technologie detailliert erläutert werden, deren grundlegenden Erkenntnisse aus den Arbeiten der Forschergruppen um Vogelstein und Gillespie (1979) sowie Boom *et al.* (1990) stammen.

Der Aufschluss der Zellen erfolgt im alkalischen Milieu, meist unter Zusatz von Detergenzien wie Triton X-100, SDS, Sarcosyl oder Cetyltrimethylammoniumbromid (CATB), wobei oftmals mehrere der genannten Stoffe in Kombination eingesetzt werden (Sambrook *et al.*, 1989; Peterson und Sigler, 1998; van Burik, 1998). Detergenzien sind amphipatische, oberflächenaktive Substanzen, deren Moleküle polare und nichtpolare Regionen besitzen. Sie binden sich an hydrophobe Moleküle und lösen diese in wässrigen Phasen. Damit eignen sie sich ideal zur Lyse der Zellmembran, welche aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Zum Teil werden auch Enzyme wie beispielsweise Proteinase K verwendet, die in Puffern mit solchen Agenzien hohe Aktivität besitzen (Gross-Bellard *et al.*, 1973). Außerdem empfiehlt sich für den Zellaufschluss von Schimmelpilzen eine mechanische Behandlung, z.B. in Form von Glass Beads, die dem Lysepuffer zugesetzt werden können (van Burik 1998).

Nach dem Aufschluss der Zellen wird die freie DNA unter Verwendung chaotroper Salze an die Silika-Membran gebunden. Dazu wird in den meisten veröffentlichten oder kommerziell angebotenen Methoden eines der Salze Guanidinthiocyanat, Guanidinhydrochlorid oder Natriumperchlorat verwendet (Carter und Milton, 1993; Wolfe *et al.*, 2002). Die Bindung beruht auf der Eigenschaft chaotroper Substanzen, dem DNA-Strang Wassermoleküle zu entziehen. Dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der neutralen DNA-Silikakomplexe verschoben, wodurch die DNA mit den OH-Gruppen des Silikas interagieren kann (Melzak *et al.*, 1996). Dies ist schematisch in Abbildung 3 in Anlehnung an Yuen (2006) dargestellt.

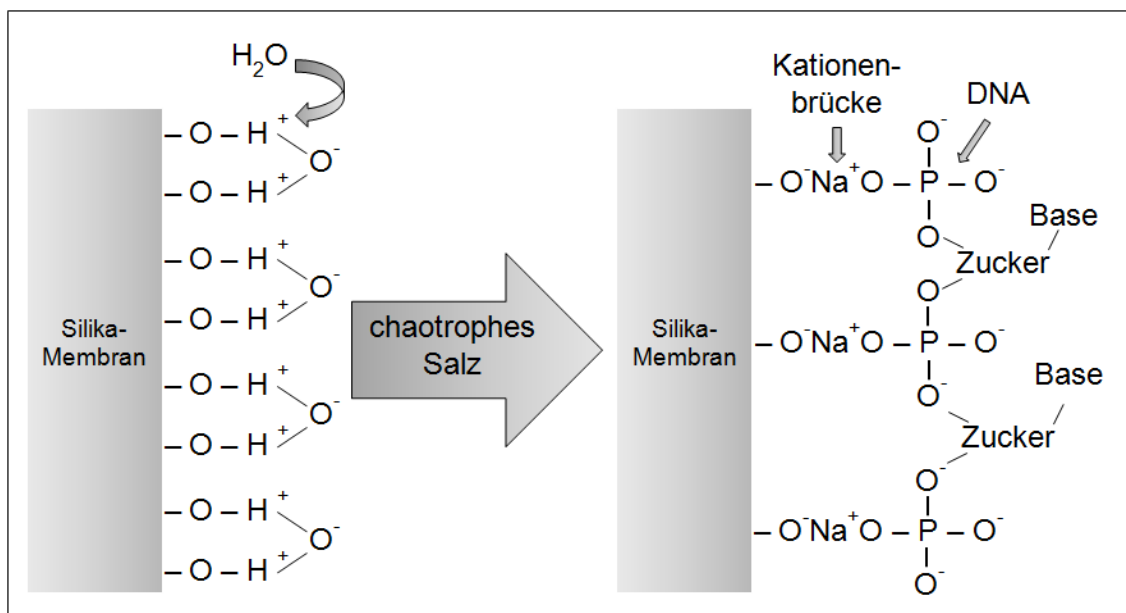


Abbildung 3: DNA-Bindung an eine Silika-Membran

Die Silika-Matrix kann entweder in Form einer Suspension, der so genannten Glas-milch, oder aber auch in Form einer festen Membran in einem Säulchen verwendet werden, welches auch als Spin-Column bezeichnet wird. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Spin-Säulchen verwendet, durch die das Lysat der Probe zentrifugiert wurde.

Im Anschluss wird die Silika-Membran mit Waschpuffern beladen, um Verunreinigungen aus der Silika-Matrix zu lösen, während die DNA gebunden bleibt. Zunächst erfolgt zumeist ein Waschschriff mit einem Puffer, der ebenfalls ein chaotropes Salz enthält. Somit bleibt die DNA an die Silika-Membran gebunden. In einem zweiten Waschschriff wird häufig ein ethanolhaltiger Puffer verwendet; auch in diesem Fall bleibt die DNA in der Silika-Matrix gebunden. Diese Eluate werden nach der Zentrifugation des Säulchens jeweils verworfen. Abschließend erfolgt die Elution der DNA mit Wasser oder aber einem TE-Puffer mit einem pH-Wert über 7,0.

## 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.2.2.1 Grundprinzip der PCR

Die Technologie der PCR basiert auf zwei grundlegenden Erkenntnissen: Eine Arbeitsgruppe um Kleppe *et al.* beschrieb im Jahr 1971 ein Verfahren zur biochemischen Amplifikation von DNA *in vitro*. Darauf aufbauend veröffentlichte im Jahre 1986 Mullis ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA unter Verwendung einer temperaturstabilen DNA-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.

Ein PCR-Reaktionszyklus läuft in drei temperaturspezifischen Schritten ab. Zunächst erfolgt das Aufschmelzen bzw. Denaturieren der doppelsträngigen DNA, welche in dieser Form als Matrix für eine enzymatisch katalysierte Polymerisation von Desoxyribonukleotiden zur Verfügung steht. Kühlt das Reaktionsgemisch ab, lagern sich Primer an den DNA-Einzelstrang an und markieren damit den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Primer sind Oligodesoxyribonukleotide, die eine zur Ziel-DNA komplementäre Basenabfolge aufweisen, und die als Startpunkt für die DNA-Polymerisation dienen. Im abschließenden Schritt, der Elongation, werden durch die DNA-Polymerase im Reaktionsgemisch vorliegende freie Desoxynukleosid-Triphosphate an den DNA-Strang angelagert. Der neu entstandene DNA-Strang, welcher auch als Amplifikat bezeichnet wird, steht im nächsten Reaktionszyklus wiederum als Matrize zur Verfügung (Mohr *et al.*, 2004). Mit jedem Reaktionszyklus verdoppelt sich also theoretisch die Anzahl der Amplifikationsprodukte. Allerdings ergaben praktische Untersuchungen, dass die PCR-Reaktion nicht der Idealfunktion  $2^n$  ( $n$  = Anzahl der Reaktionszyklen) folgt, sondern dass die Basis der Exponentialfunktion im Mittel Werte zwischen 1,6 bis 1,7 annimmt (Kainz, 2000).

### 2.2.2.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR-Technologie dar. Sie bietet die Möglichkeit, die Vervielfältigung der DNA mittels fluoreszierender Farbstoffe in Echtzeit zu verfolgen. Dies kann beispielsweise durch Verwendung von Substanzen wie SYBR Green I geschehen, die sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA-Abschnitte binden. Im Anschluss an die eigentliche Real-Time PCR-Reaktion werden die PCR-Produkte mittels der so genannten Schmelzkurvenanalyse untersucht. Über einen Temperaturgradienten werden

doppelsträngige PCR-Produkte aufgeschmolzen. Dabei lässt sich bei einer bestimmten Temperatur ein Peak in der Fluoreszenzausbeute feststellen. Dieser ist vom G/C-Gehalt des DNA-Abschnitts sowie der Länge des PCR-Produkts abhängig und gibt an, bei welcher Temperatur der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wieder in Lösung geht, d.h. wann die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufschmilzt. Diese Anwendung eignet sich ideal zur Auswahl und Optimierung von Primern, da sich unspezifische PCR-Produkte sehr gut erkennen lassen (Bustin und Nolan, 2004a; Ponchel, 2006). Exemplarisch ist dies in Abbildung 4 dargestellt.

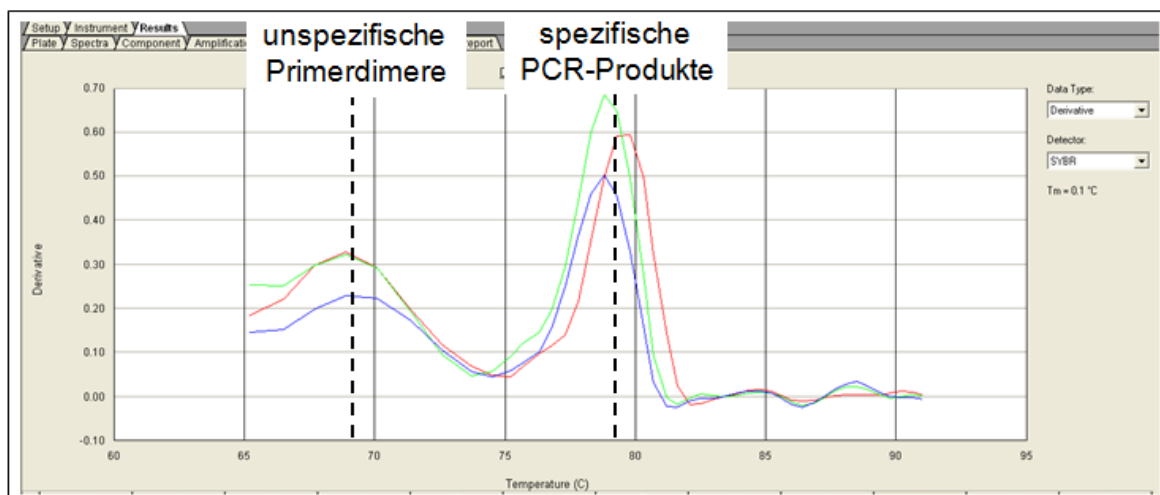


Abbildung 4: Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung von SYBR Green I

Eine zweite Möglichkeit stellt die Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide dar, die auf der Zielsequenz hybridisieren. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Nachweis erfolgt die Bindung der Sonden sequenzspezifisch.

Eine Vielzahl von Sondensystemen beruht auf dem Prinzip der Zunahme eines Resonanzenergie transfers von einem Donor- auf einen Akzeptorfluorophor. Bei diesem Fluoreszenz-Resonanzenergie transfer (FRET) handelt es sich um einen spektroskopischen Prozess, welcher strahlungsfrei Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren über einen Bereich von 10-80 pm überträgt (Wu und Brand, 1994). Damit ein Energie transfer stattfinden kann, müssen der Donor und der Akzeptor in Resonanz stehen. Das bedeutet, dass sich das Fluoreszenzspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen muss. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt (in Anlehnung an o.V., 2005).

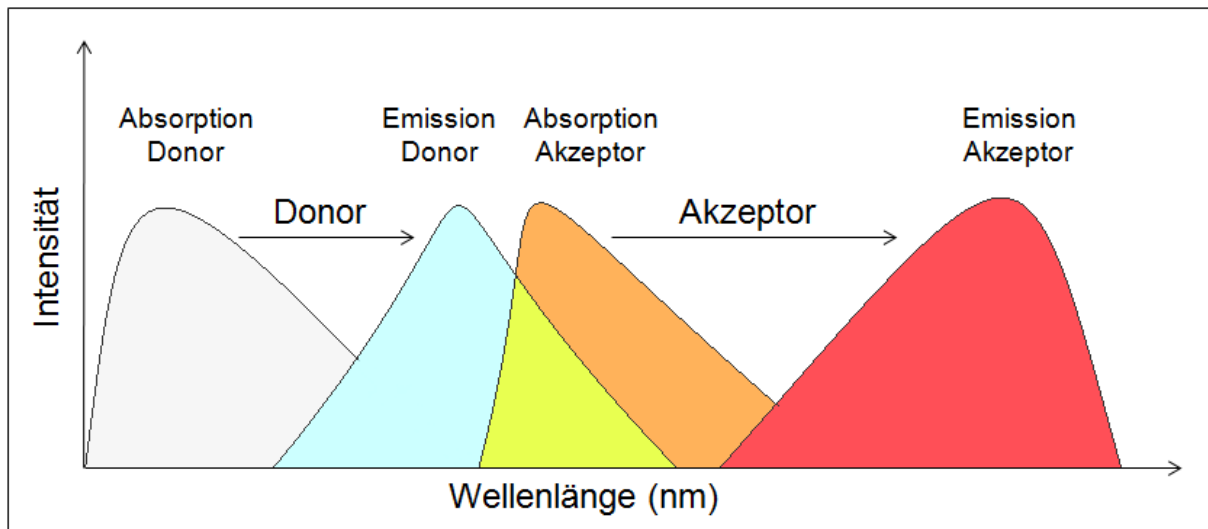


Abbildung 5: Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer von Donor auf Akzeptorfluorophor

In den beiden Real-Time Multiplex PCR-Systemen, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden, werden ausschließlich Hydrolysesonden eingesetzt, die auch als TaqMan™-Sonden bezeichnet werden. Deshalb werden auch nur solche an dieser Stelle beschrieben. Die TaqMan™-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert. Im Zuge der Amplifikation wird diese Sonde, wenn sie an die zu amplifizierende DNA gebunden ist, durch eine mit der Taq-Polymerase assoziierte doppelstrangspezifische Exonukleaseaktivität hydrolysiert. Damit ist der FRET unterbrochen und das Fluoreszenzsignal des Donors kann detektiert werden. Diese Technik wurde erstmals von Holland 1991 beschrieben. Weiterentwickelt wurde die Methode von einer Arbeitsgruppe um Lee im Jahr 1993. Danach war es erstmals möglich, die Analyse ohne Post-PCR-Schritte durchzuführen.

Abbildung 6 zeigt in Anlehnung an Schild (2003) und van der Velden *et al.* (2003) in der linken Hälfte den schematischen Ablauf einer Real-Time PCR unter Verwendung einer TaqMan™-Sonde, während rechts der Verlauf der Fluoreszenzkurven, sogenannte Standard-Kurven, einer Verdünnungsreihe über die Anzahl der Reaktionszyklen aufgenommen ist.

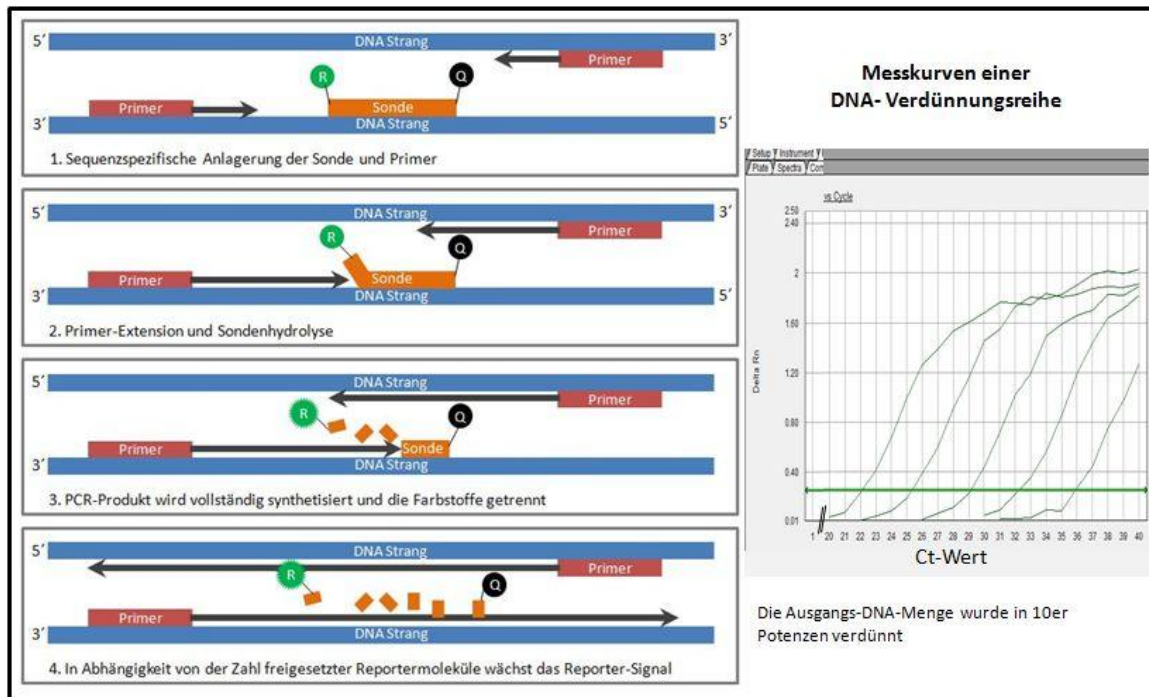


Abbildung 6: Ablauf einer Real-Time PCR-Reaktion unter Verwendung einer TaqMan™-Sonde und die daraus resultierenden Messkurven

Im linken Teil der Abbildung 6 ist zu erkennen, dass im ersten Schritt sich Primer und Sonde an den DNA-Einzelstrang anlagern. Reporter (R) und Quencher (Q) befinden sich zu diesem Zeitpunkt noch in räumlicher Nähe. Der zweite Schritt veranschaulicht die Verlängerung des DNA-Einzelstrangs ausgehend von den Primern. Die Taq-Polymerase, welche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, erreicht die Sonde und verdrängt diese aufgrund ihrer enzymatischen Eigenschaft vom DNA-Strang. Während dieses Schritts wird die Sonde zerstört.

In Schritt 3 wird der DNA-Strang vollständig synthetisiert, die Sonde ist in einzelne Fragmente gesplittet. Schritt 4 zeigt, dass Reporter und Quencher nun räumlich getrennt vorliegen. Durch Lichtenergie wird der Reporterfarbstoff nun angeregt und fluoresziert. Dieses Fluoreszenzsignal kann wiederum von einer optischen Einrichtung gemessen werden.

Durch die Real-Time PCR-Technologie ist es möglich, den Zeitpunkt der exponentiellen PCR-Produktzunahme zu bestimmen. Dieser Wert wird als Ct-Wert bezeichnet (vgl. rechter Teil der Abbildung 6) und ist Grundlage für die Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNA im Reaktionsgemisch (Higuchi, 1993). Über die Messung von Standardkurven bekannter DNA-Mengen des gleichen Templates wie in der Probe, kann eine unbekannte DNA-Menge berechnet werden. Dieser Ansatz wird als absolute Quantifizierung bezeichnet.

### 2.2.2.3 Real-Time Multiplex PCR

Mit Real-Time Multiplex PCR wird die Detektion von zwei oder mehr DNA-Targets in einem PCR-Reaktionsgefäß bezeichnet. Damit lassen sich mehrere Informationen mit Hilfe eines einzigen PCR-Reaktionsansatzes generieren. Dies ist nicht nur material- und zeitsparend, sondern wird insbesondere bei Untersuchungen mit limitiertem Probenmaterial eingesetzt (Bustin, 2000).

Verschiedene Forschergruppen konnten bereits zeigen, dass eine auf TaqMan™-Sonden basierende Real-Time Multiplex PCR mit bis zu vier Targets möglich ist, ohne dass die Sensitivität im Vergleich zu den Einzelreaktionen wesentlich beeinträchtigt wird (Grace *et al.*, 2003; Woron *et al.*, 2006). Bei den beiden hier vorgestellten Real-Time Multiplex PCR Assays werden jeweils drei DNA-Templates in einer PCR-Reaktion detektiert. Zur Unterscheidung der Assays müssen die drei verwendeten TaqMan™-Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen als Reporter markiert werden, um die drei Amplifikate während der Analyse differenzieren zu können (Mackay *et al.*, 2002). Dazu stehen grundsätzlich eine Reihe unterschiedlicher Fluorophore zur Verfügung, allerdings gilt es bei der Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffs folgende Kriterien zu beachten:

- (1) Der Fluorophor muss auf der verwendeten Messplattform detektierbar sein, das heißt, Absorptions- und Emissionsspektrum müssen in einem bestimmten Wellenlängenbereich liegen.
- (2) Absorptions- und Emissionsspektrum der einzelnen Fluorophore müssen sich deutlich unterscheiden, so dass es zu keiner Überlagerung zwischen den gemessenen Spektren kommt, da diese Interferenzen das Messergebnis negativ beeinflussen würden (Bustin, 2002).
- (3) Der Fluorophor sollte eine möglichst hohe Fluoreszenzausbeute liefern (Bustin und Nolan, 2004a). Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass hier in Bezug auf die Messplattform zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen einzelnen Farbstoffen bestehen (vgl. Abschnitt 4.4.4).
- (4) Neben der Auswahl des Reporters spielt auch die Markierung des Quenchers eine entscheidende Rolle. Dazu werden in der Regel sogenannte Black Hole Quencher (BHQ) verwendet, welche die übertragene Lichtenergie lediglich in Form von Wärme abstrahlen und keine Eigenfluoreszenz besitzen (Parkhurst und Parkhurst, 1995).

Bei der Entwicklung von Real-Time Multiplex PCR Assays ist besonderes Augenmerk auf die Auswahl von Primern und Sonden zu legen. Diese Komponenten müssen zwingend aufeinander abgestimmt sein, um Interaktionen zu vermeiden und maximale Amplifikationseffizienz zu gewährleisten (Persson *et al.*, 2005). Zur Berechnung der PCR-Effizienz können je nach Quantifizierungsart, absolut oder relativ, verschiedene Methoden angewandt werden (Pfaffl, 2004). Da die Quantifizierung der DNA-Menge in der vorliegenden Arbeit anhand von Standard-Kurven (vgl. Abbildung 6) vorgenommen wurde, beruht die Berechnung der PCR-Effizienz auf der Formel nach Rasmussen (2001).

Formel 1: Berechnung der PCR-Effizienz

$$E = 10^{\left(\frac{1}{m}\right)} - 1$$

$m$  = Steigung der Regressionsgeraden ermittelt aus den Standardkurve

Die PCR-Effizienz in Verbindung mit dem Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden lässt wiederum Rückschlüsse auf das Primer- und Sondendesign zu. Effizienzwerte unter 90 % deuten auf schlechtes Bindungsverhalten der Oligonukleotide hin. Werden hingegen Werte über 110 % ermittelt, indiziert dies die Bildung unspezifischer PCR-Produkte (Brisson *et al.*, 2004). Eine 100 %ige PCR-Effizienz ist demnach bei einer Verdoppelung der DNA-Menge nach 3,32 Zyklen erreicht.

Neben der Effizienz ist auch die Ermittlung der Nachweisgrenze für den zu detektierenden Organismus von Interesse. Die Anzahl der in einem Assay nachgewiesenen Genomkopien kann mit Formel 2 berechnet werden (o.V., 2003).

Formel 2: Berechnung der Genomkopien

$$\text{Anzahl der Genomkopien} = \frac{\text{Nachweisgrenze}}{m}$$

$$\text{mit Genommasse } m = n \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}}$$

und  $n$  = Genomgröße in Basenpaaren



## 2.2.3 Auswahl von Primer und Sonde

### 2.2.3.1 Allgemeine Parameter

Primer und Sonde zum Nachweis eines Zielorganismus können mit Hilfe von Software, beispielsweise Primer Express<sup>®</sup> von Applied Biosystems, automatisch bestimmt werden. Daneben besteht auch die Möglichkeit, manuell vorzugehen, wobei anhand von Sequenzvergleichen, sogenannten Alignments, ein geeigneter DNA-Abschnitt ausgewählt wird. Beide Verfahren unterliegen gewissen Rahmenbedingungen, von denen im Folgenden einige aufgeführt sind (Bustin und Nolan, 2004a; Sen *et al.* 2004).

#### (1) Primer

- Am 3'-Ende möglichst ein G oder C, dadurch wird die Bindungseffizienz erhöht
- Länge: 15-25 Basen
- GC-Gehalt: ideal 50 %
- Schmelzpunkt: 55°C bis 60°C, wobei die Schmelztemperatur beider Primer möglichst identisch sein oder aber maximale Unterschiede von 1- 2°C aufweisen sollte
- Die Sequenz muss so gewählt sein, dass es zu keinem Self-Annealing kommt
- Primerdimere haben einen negativen  $\Delta G$  Wert, dieser sollte nicht unter -10 kcal/mol liegen
- Drei bis vier Wiederholungen der gleichen Base hintereinander sind zu vermeiden, insbesondere sollten keine Poly-G Abschnitte vorliegen

#### (2) Sonde

- Lage: Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes eines PCR-Primers befinden
- Länge: 20-30 Basen, möglichst nicht länger als 30 Basen
- GC-Gehalt: ideal 50 %
- Schmelzpunkt: Primer- $T_m$  um ca. 5-10°C unter dem Sonden- $T_m$ , in etwa 68°C bis 70°C
- Am 5'-Ende der Sonde kein G

- Nie mehr als drei- bis viermal dieselbe Base hintereinander, insbesondere keine Poly-G Abschnitte
- Falls bei einer gegebenen Sondensequenz auch der komplementäre Strang verwendet werden kann, sollte der C-haltigere Strang ausgewählt werden
- Keine Komplementarität zwischen Sonde und PCR-Primern
- Möglichst keine auffälligen Sekundärstrukturen im Zielbereich, bei Primern und Sonde

Wie weit sich die geforderten Rahmenbedingungen erfüllen lassen, hängt maßgeblich von der DNA-Struktur ab, welche als Target für den PCR-Nachweis dient. Im kommenden Abschnitt wird dies kurz erläutert.

#### 2.2.3.2 Molekularbiologische Parameter

In allen Organismen sind die Ribosomen für die Translation der messenger-RNA in die entsprechende Aminosäuresequenz verantwortlich. Bei Eukaryonten besteht das 80S-Ribosom aus einer 40S-Untereinheit und einer 60S-Untereinheit. Die 40S-Untereinheit setzt sich wiederum aus der 18S-RNA und Proteinen zusammen. In der 60S-Untereinheit befinden sich neben Proteinen auch die 5S-, 5,8S- und 28S-RNA.

Der Aufbau der Ribosomen verschiedener Schimmelpilze unterscheidet sich vornehmlich durch die Proteinanzahl und deren Zusammensetzung. Die RNA-Einheiten haben gleiche Sedimentationsgeschwindigkeiten. Im Genom der Eukaryonten sind die 5,8S-, 18S-, und die 28S-RNA in Form eines Genclusters organisiert. Diese kodierenden Stücke werden, wie in Abbildung 7 in Anlehnung an Russel (1992) dargestellt, durch nicht-kodierende Teilbereiche, den internal transcribed spacer Regionen (ITS-Regionen) getrennt sowie den external transcribed spacer Regionen (ETS-Regionen) flankiert.

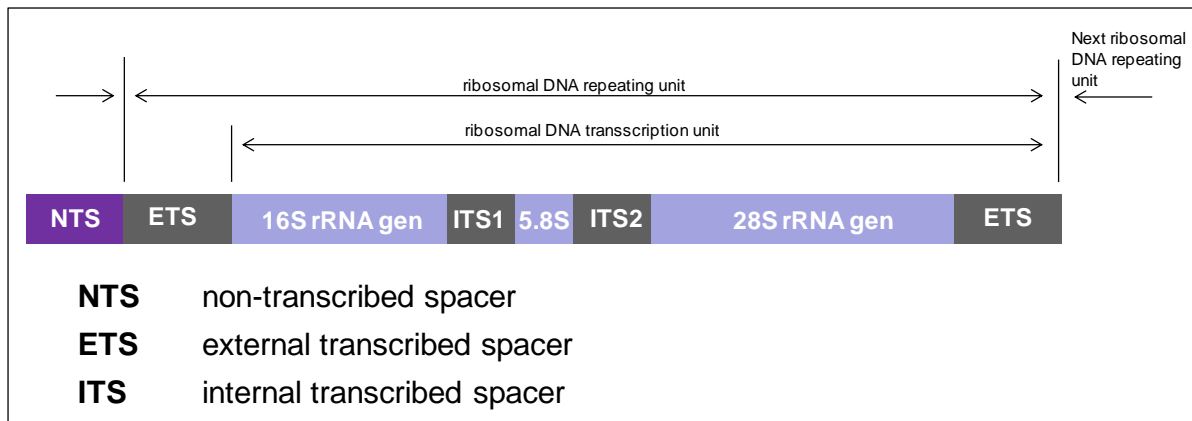


Abbildung 7: Aufbau einer rDNA repeat unit

Die Informationen der Ribosomenbausteine sind auf der rDNA der Eukaryonten kodiert. Die rDNA-Gene liegen in großer Anzahl hintereinander vor und sind nur durch die non-transcribed Spacer (NTS) getrennt. Im Gegensatz zu einfach vorliegenden Genen ist die Anzahl dieser Gencluster pro Zelle wesentlich höher und macht sie damit zu einer besonders geeigneten Zielregion für PCR-Systeme (Guarro *et al.*, 1999). Denn bei gleicher Zellzahl in einer Probe stehen demnach mehr DNA-Moleküle aus ribosomaler DNA als aus anderen DNA-Bereichen zur Amplifikation zur Verfügung, womit für den Nachweis von Zellen wiederum eine niedrigere Nachweisgrenze des PCR-Systems erzielt werden kann.

Die ribosomalen Strukturgene (18S, 5,8S, 28S) sind sequenziell stark konserviert. Phylogenetisch lassen sich diese Informationen nutzen, um Organismen einer Ordnung zuzuweisen. Darüber hinaus lassen sich diese Abschnitte innerhalb der PCR-Methodik gut für die Entwicklung von Screening-Tests verwenden (McCartney *et al.*, 2003). Screening-Tests sind Verfahren, mit denen bestimmte Gruppen von verwandten Mikroorganismen oder Mikroorganismen mit gleichen Eigenschaften, beispielsweise der Fähigkeit zur Lactatbildung, gemeinsam erfasst werden sollen. Die ITS- und IGS-Regionen verschiedener Organismen weisen größere Sequenzunterschiede auf. Damit lassen sich verschiedene Arten einer Ordnung unterscheiden bzw. mittels PCR identifizieren (Mitchell *et al.*, 1995).

### 2.2.3.3 Technische Parameter

Neben den oben aufgeführten Faktoren wird die Entwicklung eines Real-Time Multiplex PCR Assays noch durch die verwendete Messplattform determiniert. Für die hier vorgestellten Entwicklungen und Untersuchungen wurde ein ABI PRISM® 7000 Real-Time PCR Thermocycler von Applied Biosystems verwendet.

Neben dem Thermoblock, welcher die Reaktionsgefäße aufheizt und abkühlt, gehört die optische Einheit zum wichtigsten Bestandteil des Geräts. Die Anregung der Fluorophore erfolgt bei 488 nm mit monochromatischem Licht, erzeugt durch eine Tungsten Halogen Lampe. Über einen dichroitischen Spiegel wird das Licht in die einzelnen Reaktionsgefäße gelenkt. Das Gerät verfügt über vier Detektionsfilter, welche die Emission der Lichtenergie im Bereich von 500 nm bis 660 nm detektieren können. Aufgenommen werden die Daten von einer CCD Kamera und mittels Software ausgewertet.

### 2.2.4 PCR-Nachweis von *Alternaria alternata* und *Phoma betae*

Für den Nachweis von *Alternaria alternata* waren zu Beginn der Arbeit in zwei Veröffentlichungen PCR-Systeme beschrieben, wobei das zweite auf dem ersten aufbaute (Zur *et al.*, 1999; Zur *et al.*, 2002). Die beiden Systeme beruhen auf der Amplifikation eines Teilstücks der ITS 1 und ITS 2 Regionen mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Des Weiteren sind auf der Homepage der EPA (Environmental Protection Agency) patentrechtlich geschützte Sequenzdaten zum Nachweis von *Alternaria alternata* mittels Real-Time PCR veröffentlicht, die ein Teilstück der ITS 1 Region amplifizieren (Haugland und Vesper, 2002).

In einer Veröffentlichung ist der Nachweis von *Phoma betae* beschrieben, der auf der Amplifikation eines Teilstücks des Actin Gens und der ITS 1 und ITS 2 Region beruht. Beide PCR-Produkte werden nach PCR mit Restriktionsenzymen verdaut und im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Anhand der Bandenmuster ist eine Unterscheidung zwischen *Phoma betae* und anderen Schädlingen der Zuckerrübe möglich (Weiland und Sundsbak, 2000).

### 2.2.5 PCR-Nachweis von *Fusarium* Spezies

Im Gegensatz zu den beiden in Punkt 2.2.4 vorgestellten Pathogenen existieren für den Nachweis von *Fusarium* Spezies auf PCR-Basis eine große Anzahl veröffentlichter Methoden. Dabei wurden sowohl Screening-Methoden als auch spezifische Nachweismethoden für bestimmte Spezies der Gattung *Fusarium* beschrieben. In einer Übersicht nach Niessen aus dem Jahre 2001 sind bereits 31 verschiedene Systeme aufgeführt. Alle im Einzelnen zu besprechen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, deshalb soll lediglich auf einige ausgewählte Publikationen näher eingegangen werden.

Von besonderem Interesse im Hinblick auf den Themenbereich dieser Arbeit sind Real-Time PCR-Systeme, die den Nachweis von *Fusarium* Spezies an Cerealien verfolgen. Aufgrund der großen Anzahl verschiedener *Fusarium* Spezies richtete sich der Fokus auf diejenigen Arten, welche bisher besonders häufig auf Gerste und Weizen nachgewiesen wurden. Dazu wurden die Resultate verschiedener empirischer Studien miteinander verglichen. Die Ergebnisse ausgewählter Studien nach Niessen (1993), Müller (1995), Brunner und Adler (2004) sowie Lienemann (2002) sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Feldbesatz verschiedener *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen aus verschiedenen Literaturquellen

| Quelle  |                                  | Anteil jeweilige <i>Fusarium</i> Spezies auf Gerste [%] |        |                | Anteil jeweilige <i>Fusarium</i> Spezies auf Weizen [%] |           |           |
|---------|----------------------------------|---|--------|----------------|---|-----------|-----------|
|         |                                  | Niessen   | Müller | Brunner/ Adler | Brunner/ Adler  | Lienemann | Lienemann |
| Spezies | <i>Fusarium avenaceum</i>        | 29,2  | 1,0    | 29,1           | 16,3  | 35,0      | 40,0      |
|         | <i>Fusarium cerealis</i>         | 0,0   | 0,0    | 1,4            | 2,0   | 5,0       | 6,0       |
|         | <i>Fusarium culmorum</i>         | 0,4   | 2,0    | 1,4            | 4,1   | 24,0      | 14,0      |
|         | <i>Fusarium equiseti</i>         | 4,3   | 14,0   | 14,2           | 3,1   | 1,0       | 2,0       |
|         | <i>Fusarium graminearum</i>      | 17,6  | 5,0    | 1,9            | 4,3   | 14,0      | 11,0      |
|         | <i>Fusarium poae</i>             | 4,7   | 5,0    | 19,0           | 59,3  | 17,0      | 11,0      |
|         | <i>Fusarium sporotrichioides</i> | 25,2  | 0,0    | 1,9            | 0,5   | 1,0       | 2,0       |
|         | <i>Fusarium tricinctum</i>       | 15,2  | 71,0   | 27,8           | 7,8   | 3,0       | 11,0      |
|         | <i>Fusarium</i> Spezies          | 3,4   | 1,0    | 3,5            | 2,8   | 0,0       | 3,0       |

Die in Tabelle 2 dargestellten Daten beruhen auf Untersuchungen in Deutschland und Österreich. Das Spektrum der aufgeführten *Fusarium* Spezies deckt sich auch mit Untersuchungen in den USA, Frankreich, Italien und Litauen, allerdings lassen sich Unterschiede in der Befallsdichte je Spezies feststellen (Salas *et al.*, 1999; Bottalico und Perrone, 2002; Iqbal *et al.*, 2004; Mačkinaitė *et al.*, 2006).

In verschiedenen Publikationen werden zum einen Screening PCR-Systeme für die Detektion mehrerer *Fusarium* Spezies beschrieben und zum anderen sind Identifizierungsassays für den spezifischen Nachweis einzelner *Fusarium* Gattungen veröffentlicht. Eine häufig genutzte Möglichkeit stellt in diesem Zusammenhang die Detektion eines Teilbereichs in einem spezifischen Genabschnitt dar, welcher beispielsweise für die Biosynthese verschiedener Mykotoxine ausschlaggebend ist. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Gene für die Trichothecene und Fumonisin Biosynthese zu nennen, die als Targets für Real-Time PCR Assays genutzt werden (Lee *et al.*, 2001b; Schnerr *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu dieser gruppenspezifischen Detektion von *Fusarium* Spezies kann ein Teilstück des  $\beta$ -Tubulins auch zum spezifischen Nachweis von *Fusarium graminearum* dienen (Reischer *et al.*, 2004). Des Weiteren ist in einer Veröffentlichung ein Real-Time PCR-System zum Screening von *Fusarium* Spezies auf Basis der Amplifikation eines rDNA-Fragments beschrieben (Bluhm *et al.*, 2004).

Laut Herstellerangaben des in dieser Arbeit verwendeten Real-Time Multiplex PCR Assays konnte nach Vergleich der Sequenzdaten der in Tabelle 2 aufgeführten *Fusarium* Spezies eine molekularbiologische Einteilung in zwei Gruppen vorgenommen werden. Zum einen ist die Detektion aller Spezies durch einen identischen DNA-Sequenzabschnitt möglich, zum anderen konnte ein Real-Time PCR-System entwickelt werden, das aus der Gesamtheit der oben genannten Arten spezifisch *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* und *Fusarium cerealis* erfasst. Dies hat aus phytopathologischer Sicht den Vorteil, dass somit eine separate Detektion der drei bedeutendsten Pathogene für Weizen durchführbar war (Hernández *et al.*, 2000). Zudem war der getrennte Nachweis dieser Gruppe im Hinblick auf die genauere Untersuchung des Gushing Phänomens von Vorteil, insbesondere weil aus der Gesamtheit der *Fusarium* Spezies *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* häufig als Hauptverursacher des primären Gushings beschrieben werden. Daneben wird beiden Spezies die Fähigkeit zur stärkeren Toxinbildung im Vergleich mit anderen *Fusarium* Spezies zugeschrieben (Miller, 1994; Mesterházy, 2002).

Im folgenden Text wird die Gruppe der drei oben genannten *Fusarium* Spezies als die der starken Toxinbildner zusammengefasst.

Um auch an dieser Stelle verschiedene Proben nach der Messung miteinander vergleichen zu können, wurde der Besatz an *Fusarium* Spezies in der Probe auf die Menge an isolierter Gersten- bzw. Weizen-DNA bezogen. Dazu eignen sich Housekeeping Gene, welche in bekannter Kopienzahl in einem Organismus vorliegen. Für die Auswahl war grundlegend, dass das Gen in beiden Getreidearten über einen gemeinsamen konservierten Bereich verfügt, welcher sich zur Amplifikation mittels Real-Time PCR eignet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

| Bezeichnung                    | Modell  | Hersteller   |
|--------------------------------|---|--|
| Brutschrank                    | Incucell  | MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing, Deutschland                    |
| Mikroskop                      | Standard 25   | Zeiss, Jena, Deutschland   |
| Minizentrifuge                 | GMC-060   | Tanaka Bldg Hongo, Tokyo, Japan  |
| Real-Time PCR Thermocycler     | ABI Prism® 7000 Sequence Detection System                 | Applied Biosystems Foster City, U.S.A  |
| PCR Thermo-cycler              | PTC 200   | MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland                                  |
| pH Messgerät                   | WTW pH 521  | WTW, Weilheim O.B., Deutschland  |
| Photometer                     | UV Spectrometer Ultraspec 3100 pro                        | Amersham Biosciences Buckinghamshire, England                                |
| Pipetten                       | Pipetman  | Gilson, Middleton, USA   |
| Probenzerkleinerung            | TissueLyser;<br>Universal laboratory mixer-mill disruptor | Qiagen GmbH Hilden, Deutschland  |
| Probenzerkleinerung            | Type KE 02T/S   | Krone- Mühlen- u. Gerätebau; Schuchardt und Beckmann Gevelsberg, Deutschland |
| Sofortbildkamera               | MP4   | Polaroid, Offenbach, Deutschland   |
| Laminar Flow                   | BDK-S 1200  | BDK Luft & Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl Genkingen, Deutschland           |
| Thermoblock                    | Vortemp 56 EVC  | Uniequip, Martinsried, Deutschland   |
| UV-Lichttisch                  | Reprostar   | CAMAG, Berlin, Deutschland   |
| Reagenzglas-schüttler          | Vortex Genie 2  | Scientific Industries Inc., Chicago, USA                                     |
| Waage                          | BP 4100 S   | Sartorius AG Göttingen, Deutschland  |
| Zentrifuge für Eppendorfgefäße | Hermle Z252 MK  | Hermle-Labortechnik, Wehingen, Deutschland                                   |
| Zentrifuge für Falcon tubes    | Laborfuge A   | Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland                                   |



## 3.1.2 Reagenzien und Kits

| Bezeichnung  | Artikelnummer | Hersteller  |
|--|---------------|---|
| 2,5x RealMasterMix                                   | 954160203     | Eppendorf AG<br>Hamburg, Deutschland                |
| 2-Propanol   | 9079-35       | Zefa Laborservice<br>München, Deutschland           |
| 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)            | 6979.2        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| AgarAgar   | 5210.3        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| Agarose NEE0   | 2267          | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| DNA-Längenmarker peqGold                             | 25-2300       | PeqLab,<br>Erlangen, Deutschland                    |
| Ethanol, absolut                                     | 8006          | Zefa Laborservice<br>München, Deutschland           |
| Ethidiumbromid                                       | 46067         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH<br>Steinheim, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                  | 1084180250    | Merck KGaA<br>Darmstadt, Germany                    |
| Glycerin   | GL0028        | Zefa Laborservice<br>München, Deutschland           |
| Guanidinhydrochlorid                                 | 0037          | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)                  | 1081300100    | Merck KGaA<br>Darmstadt, Germany                    |
| Malzextrakt  | AE68.1        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| Natriumchlorid                                       | 1064041000    | Merck KGaA<br>Darmstadt, Germany                    |
| Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate [SDS]) | L-5750        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH<br>Steinheim, Deutschland |
| Natronlauge  | T197.1        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| N-Lauroylsarcosine Na-Salz (Sarcosyl)                | L-5125        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH<br>Steinheim, Deutschland |
| NucleoSpin Plant                                     | 740570        | Macherey-Nagel<br>Düren, Deutschland                |
| Nukleosidtriphosphate (dNTP)                         | K039.1        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                      |
| Perfectprep® Gel Cleanup Kit                         | 955152000     | Eppendorf AG<br>Hamburg, Deutschland                |
| PVPP   | PVP-10        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH<br>Steinheim, Deutschland |
| Qiagen Dneasy® Plant mini                            | 69104         | Qiagen GmbH<br>Hilden, Deutschland                  |

| Bezeichnung   | Artikelnummer | Hersteller                                       |
|---|---------------|--|
| QuantiTect® Multiplex PCR Kit   | 204543        | Qiagen GmbH<br>Hilden, Deutschland               |
| QuantiTect® SYBR Green PCR Kit  | 204143        | Qiagen GmbH<br>Hilden, Deutschland               |
| Screen <i>Fusarium</i> spec. in cereals                                     | 1000571       | PIKA Weihenstephan GmbH<br>Freising; Deutschland |
| RNase A   | 7156          | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                   |
| Sojapepton  | 2365.1        | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                   |
| Taq DNA Polymerase, native with BSA (incl. Magnesiumchlorid und PCR Puffer) | EP0072        | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland        |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)                                       | 1083820500    | Merck KGaA<br>Darmstadt, Deutschland             |
| Triton X-100  | 3051          | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                   |
| Tween 20  | 9139          | Roth<br>Karlsruhe, Deutschland                   |
| Wasser, reinst, AMPUWA  | 40676.00.00   | Fresenius Kabi GmbH<br>Bad Homburg, Deutschland  |

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung   | Artikelnummer                | Hersteller                               |
|---|------------------------------|--|
| Pipettenspitzen                                     | 7167202, 7167203,<br>7167204 | Gilson,<br>Bad Camberg, Deutschland      |
| Biosphere MicroTube mit SafetyCap 1,5 ml und 2,0 ml | 72690200<br>72695200         | Sarstedt,<br>Nümbrecht, Deutschland      |
| Falcon tubes, 15ml                                  | 62.554.502 PP                | Sarstedt,<br>Nümbrecht, Deutschland      |
| Glass beads   | G8772                        | Sigma,<br>München, Deutschland           |
| Polaroid Film                                       | Film 667 professional        | Polaroid,<br>Offenbach, Deutschland      |
| PCR Tubes, Mutliply-µl Strip 0,2 ml                 | 72985002                     | Sarstedt,<br>Nümbrecht, Deutschland      |
| PCR Deckel, Lid chain- 0,2 ml                       | 651998002                    | Sarstedt,<br>Nümbrecht, Deutschland      |
| Mikrotiterplatte                                    | 62.554.502 PP                | Applied Biosystems<br>Foster City, U.S.A |
| Humus Ballen, hitzesterilisiert                     | 35 113/0                     | Vitakraft,<br>Bremen, Deutschland        |
| Petrischale 92 / 16                                 | 821473001                    | Sarstedt,<br>Nümbrecht, Deutschland      |

### 3.1.4 Puffer

#### TAE-Puffer

- 40 mM Tris-Acetat
- 1 mM EDTA
- 0,5 µg Ethidiumbromid pro Liter
- pH-Wert 8,0

### 3.1.5 Software

| Bezeichnung  | Beschreibung  | Hersteller  |
|--|---|---|
| Sequence Detection Software, Version 1.2<br>7500 System SDS software | Software zur Auswertung der RealTime PCR Messung  | Applied Biosystems<br>Foster City, U.S.A  |
| IDT's Oligo Analyzer Version 3.0                                     | Software zur Analyse von Oligonukleotiden;<br>auf Internetplattform:<br><a href="http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx">http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx</a> | Integrated DNA Technologies<br>Skokie, U.S.A  |
| Chromas 1.45   | Software zur Darstellung eines Chromatogramms generiert auf einem Applied Biosystems Sequencer  | School of health science,<br>Griffith University, Gold coast campus southport,<br>Queensland, Australia |
| DNASTAR<br>Lasergene (1998)  | Softwarepaket zur Bearbeitung molekularbiologischer Daten   | DNASTAR<br>Madison; U.S.A   |
| Nucleotide-nucleotide<br>BLAST                                       | Software zum Vergleich von Sequenzdaten;<br>auf Internetplattform:<br><a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>       | NCBI<br>Bethesda, U.S.A   |

### 3.1.6 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Beschreibung                              | Hersteller                    |
|-------------|---|-------------------------------|
| Primer      | Oligonukleotid ohne Fluoreszenzmarkierung | MWG<br>Ebersberg, Deutschland |
| Sonden      | Oligonukleotid mit Fluoreszenzmarkierung  | Biomers<br>Ulm, Deutschland   |

### 3.1.7 Nährmedien

#### Malzextrakt-Agar

- 30,0 g Malzextrakt
- 2,0 g Sojapepton
- 15,0 g Agar
- ad 1.000 ml VE-Wasser
- pH-Wert auf 5,6 einstellen

Das Medium wurde für 15 min bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen (T < 50°C) in Petrischalen gegossen.

#### Malzextrakt-Bouillon

- 30,0 g Malzextrakt
- 2,0 g Sojapepton
- ad 1.000 ml VE-Wasser
- pH-Wert auf 5,6 einstellen

Das Medium wurde für 15 min bei 121°C autoklaviert.

### 3.1.8 Pflanzen

Das Pflanzenmaterial wurde zum einen in Form von frischen Blättern bzw. Saatgut verschiedener sortenreiner Zuckerrübenpflanzen direkt von der KWS SAAT AG und zum anderen als sortenreine Körner von Gerste und Weizen durch die Weissheimer Malzfabrik KG zur Verfügung gestellt. Aus allen nachfolgend genannten Sorten wurde Referenz-DNA zur Validierung der beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme isoliert.

#### Zuckerrübensorten

- |             |              |               |
|-------------|--------------|---------------|
| (1) Alabama | (5) Dorena   | (9) Miranda   |
| (2) Belinda | (6) Felicita | (10) Paulina  |
| (3) Calida  | (7) Katinka  | (11) Pauletta |
| (4) Cyntia  | (8) Malenka  | (12) Ricarda  |

#### Gerstensorten

- |           |              |
|-----------|--------------|
| (1) Barke | (2) Prestige |
|-----------|--------------|

#### Weizensorten

- |             |           |
|-------------|-----------|
| (1) Hermann | (2) Malto |
|-------------|-----------|

## 3.1.9 Mikroorganismen

| Keim                                  | Stamm-<br>sammlung | Keim                                       | Stamm-<br>sammlung |
|---------------------------------------|--------------------|--|--------------------|
| <i>Acremonium strictum</i>            | DSMZ 3567          | <i>Fusarium sambucinum</i>                 | DSMZ 62397         |
| <i>Alternaria alternata</i>           | DSMZ 62006         | <i>Fusarium sporotrichioides</i>           | DSMZ 62423         |
| <i>Alternaria mali</i>                | CBS 106.24         | <i>Fusarium tricinctum</i>                 | CBS 410.86         |
| <i>Gymnascella dankaliensis</i>       | DSMZ 3568          | <i>Humicola fuscoatra</i>                  | DSMZ 63302         |
| <i>Aspergillus niger</i>              | CBS 101698         | <i>Micrococcus luteus</i>                  | CBS 78001          |
| <i>Athelia rolfsii</i>                | DSMZ 2819          | <i>Fusarium nivale var. majus</i>          | DSMZ 62281         |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>        | DSMZ 2404          | <i>Mucor mucedo</i>                        | CBS 109.16         |
| <i>Botrytis cinerea</i>               | DSMZ 877           | <i>Mucor plumbeus</i>                      | CBS 111.07         |
| <i>Byssochlamys fulva</i>             | CBS 132.33         | <i>Penicillium chrysogenum</i>             | CBS 306.48         |
| <i>Cercospora beticola</i>            | DSMZ 62107         | <i>Penicillium diversum</i>                | DSMZ 2212          |
| <i>Chrysosporium keratinophilum</i>   | DSMZ 3122          | <i>Penicillium expansum</i>                | DSMZ 62841         |
| <i>Cladosporium herbarum</i>          | DSMZ 63422         | <i>Penicillium verrucosum</i>              | CBS 302.48         |
| <i>Epicoccum nigrum</i>               | DSMZ 838           | <i>Phoma betae</i>                         | DSMZ 63181         |
| <i>Escherichia coli</i>               | DSMZ 499           | <i>Ramularia beticola</i>                  | CBS 151.67         |
| <i>Eupenicillium brefeldianum</i>     | CBS 291.62         | <i>Rhizoctonia solani</i>                  | DSMZ 63002         |
| <i>Eurotium herbariorum</i>           | CBS 114.30         | <i>Rhizopus stolonifer var. stolonifer</i> | CBS 107.76         |
| <i>Fusarium avenaceum</i>             | DSMZ 62161         | <i>Rhodotorula glutinis</i>                | CBS 324            |
| <i>Fusarium culmorum</i>              | DSMZ 1094          | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>            | DSMZ 70449         |
| <i>Fusarium equiseti</i>              | DSMZ 62202         | <i>Trichoderma koningii</i>                | CBS 459.96         |
| <i>Fusarium graminearum</i>           | DSMZ 1095          | <i>Trichoderma viride</i>                  | DSMZ 63065         |
| <i>Fusarium oxysporum</i>             | DSMZ 2018          | <i>Trichothecium roseum</i>                | CBS 567.50         |
| <i>Fusarium oxysporum f.sp. betae</i> | CBS 175.32         | <i>Verticillium dahliae</i>                | DSMZ 11938         |
| <i>Fusarium poae</i>                  | DSMZ 62376         |  |                    |

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht und Stammhaltung

#### 3.2.1.1 Mikroorganismen

Alle Schimmelpilze wurden auf Malzextrakt (ME) Agar bei einer Temperatur von 25°C für die Dauer von 7 Tagen kultiviert. Im Anschluss wurde je ein Myzelstück für die Stammhaltung auf ME Schrägagar überimpft. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 7 Tage bei 25°C. Alle Stammkulturen wurden danach im Kühlschrank gelagert.

#### 3.2.1.2 Pflanzen

Die verschiedenen Zuckerrübensorten wurden zum einen in Form von frischem Blattmaterial von verschiedenen Versuchsfeldern der KWS SAAT AG direkt zur Verfügung gestellt, zum anderen wurde die Sorte Cyntia auch als Saatgut bezogen.

Neben dem Zuckerrübensaatgut wurden auch die beiden Gersten- und Weizensorten angezüchtet.

Dazu wurden je 20 Körner in hitzesterilisierte Erde ausgesät und 12 Tage bei Raumtemperatur und Tageslicht inkubiert; Wasserzugabe erfolgte während dieses Zeitraums nach Bedarf. Nach erfolgreicher DNA-Isolierung wurde das Pflanzenmaterial verworfen.

### 3.2.2 DNA-Präparationsverfahren aus Stammkulturen

#### 3.2.2.1 Schimmelpilze

Aus den Stammkulturen der Schimmelpilze wurde jeweils ein Myzelstück in ein 15 ml Falcon tube, befüllt mit 10 ml Malzextrakt Bouillon, steril überführt und für die Dauer von 7 Tagen bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurden diese Anreicherungen bei 4.000 U/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde dem Myzel 10 ml bi-destilliertes, autoklaviertes Wasser zugesetzt und die Mischung für 1 Minute gevortext, um Reste von Nährmedium zu entfernen. Im Anschluss erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 4.000 U/min. Auch nach diesem Schritt wurde der Überstand verworfen.

Von dem so gewaschenen Myzel wurden ca. 150 mg in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mittels einer ebenfalls in Stickstoff gefrorenen 5 mm Stahlkugel wurde das Probenmaterial im TissueLyser zerkleinert. Die DNA-Extraktion wurde nach der Isolierungsvorschrift des NucleoSpin® Plant Kits, Support protocol for fungi, Macherey-Nagel, 02/2005/Rev. 03, Abschnitt 5.2, vorgenommen.

#### 3.2.2.2 Pflanzen

Die DNA-Extraktion erfolgte aus frischem Blattmaterial, um eine eventuelle Belastung durch Schimmelpilze der Feldflora möglichst gering zu halten. Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Isolierungsvorschrift des NucleoSpin® Plant Kits, Genomic DNA purification, lysis buffer C1, Macherey-Nagel, 02/2005/Rev.03, Abschnitt 5.1. Das Blattmaterial wurde mittels Mörser unter Stickstoff zerkleinert, im Anschluss wurden 150 mg für die Extraktion verwendet.

#### 3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA

Die DNA-Isolate wurden nach der Extraktion mittels UV Spectrometer Ultraspec photometrisch vermessen. Die DNA wurde dazu 1:10 mit 5 mM Tris-HCl Puffer, pH-Wert 8,0 verdünnt. Die photometrische Vermessung dient zur Bestimmung der optischen Dichte (OD), die aus dem Quotient der Messung bei 260 nm und 280 nm berechnet wird. Aus ihr kann dann wiederum die DNA-Konzentration der Probe abgeleitet werden. Die optische Dichte sollte ca. 1,8 betragen, Werte kleiner als 1,6 oder höher als 2,0 weisen auf Verunreinigungen der DNA in der Probe hin.

Ein OD-Wert von 1 entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

### 3.2.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

#### 3.2.3.1 Herstellung von PCR-Produkten

Da von dem Schimmelpilz *Phoma betae* zum Zeitpunkt der Entwicklung des Real-Time Multiplex PCR Assays noch keine Sequenzdaten im Bereich der ITS Region veröffentlicht waren, musste dieser Keim im oben genannten Bereich sequenziert werden. Die dazu notwendigen Sequenzierprimer sind Eigenentwicklungen der PIKA Weihenstephan GmbH. In Tabelle 3 ist das Pipettierschema dargestellt.

Tabelle 3: Pipettierschema der PCR zur DNA-Sequenzierung

| Bezeichnung                 | Konzentration Stammlösung | Konzentration im Mix | µl/Mix | Hersteller / Bezeichnung |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------|--------|--------------------------|
| H <sub>2</sub> O            |                           |                      | 40,6   | Ampuwa                   |
| PCR-Puffer                  | 10 x                      | 1 x                  | 7      | Fermentas                |
| dNTP's                      | 2 mM                      | 200 µM               | 7      | Roth                     |
| MgCl                        | 25 mM                     | 2,5 mM               | 7      | Fermentas                |
| Polymerase                  | 5 U/µl                    | 0,025 U/µl           | 0,35   | Fermentas                |
| Vorwärtsprimer (5'-Primer)  | 20 µM                     | 150 nM               | 0,53   | S-seq-fp_V1              |
| Rückwärtsprimer (3'-Primer) | 20 µM                     | 150 nM               | 0,53   | S-seq-rp_V1              |
| DNA                         | 1 ng/µl                   | 0,1 ng/µl            | 7      | <i>Phoma betae</i>       |

Die PCR-Reaktion wurde auf dem PCR Thermocycler PTC 200 unter Anwendung des in Tabelle 4 aufgeführten Temperaturprofils durchgeführt.

Tabelle 4: Temperaturprofil der PCR für DNA-Sequenzierungsreaktionen

| STEP | Anzahl Zyklen | Temperatur [°C] | Zeit [min] |
|------|---------------|-----------------|------------|
| 1    | 1             | 95              | 05:00      |
| 2    | 40 x          | 95              | 00:40      |
| 3    | Wiederholung  | 54              | 00:30      |
| 4    | STEP 2 - 4    | 72              | 01:00      |
| 6    | 1             | 72              | 10:00      |
| 7    | 1             | 25              | unendlich  |
| 8    |               | ENDE            |            |

Im Anschluss wurden 15,0 µl des PCR-Ansatzes mit 2,5 µl Ladepuffer gemischt und in einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Nach einer Laufzeit von 45 Minuten bei 100 V war eine deutliche PCR-Bande mit einer Länge von ca. 750 Basenpaaren im Gel zu erkennen.

### 3.2.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Bande, die das PCR-Produkt enthielt, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Eppendorf Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup Kit nach Protokollvorgaben gereinigt.

### 3.2.3.3 Sequenzierung und Auswertung der Daten

Das gereinigte PCR-Produkt wurde bei der Firma GATC Biotech mit den Primern S-seq-fp\_V1 und S-seq-rp\_V1 sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mit den Programmen Chromas 1.45 und MegAlign ausgewertet.



### 3.2.4 Temperaturprofile Real-Time PCR

Die Messung von Real-Time PCR-Reaktionen auf dem ABI PRISM 7000 erlaubt eine freie Programmierung von Temperaturprofilen. In dieser Arbeit wurden je nach Anwendung drei verschiedene Profile verwendet, die in Abbildung 8 dargestellt sind.

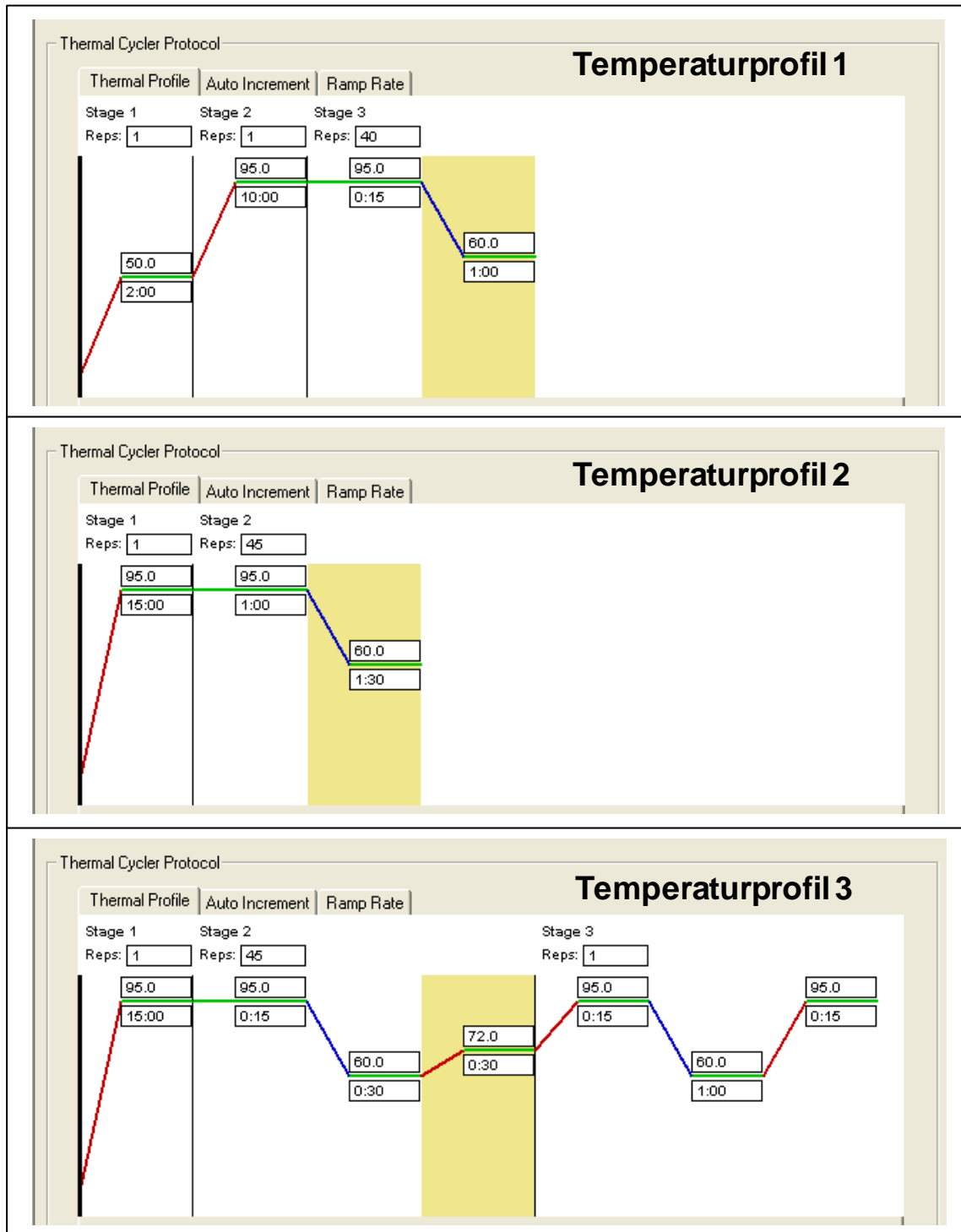


Abbildung 8: Übersicht aller verwendeten Temperaturprofile für Real-Time PCR-Ansätze

Bei Temperaturprofil 1 handelt es sich um das Standard-Temperaturprofil, welches vom Hersteller auf dem ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 hinterlegt ist. Das Temperaturprofil 2 ist für die Multiplexanwendung des Qiagen QuantiTect<sup>®</sup> PCR Master-Mix optimiert, wobei der optionale 50°C Schritt zu Beginn entfällt (o.V., 2004a). Letztlich wurde noch Temperaturprofil 3 für SYBR Green I Anwendungen genutzt, wobei sich an die eigentliche PCR ein Temperaturgradient zum Aufschmelzen der PCR-Produkte anschließt.

### 3.2.5 Bestimmung des DON-Gehalts

Der DON-Gehalt wurde mittels ELISA unter Verwendung des RIDASCREEN<sup>®</sup> FAST DON der Firma R-Biopharm (Art. No. R5901) bestimmt. Die Analysen wurden alle im Labor einer Brauerei (Kunde A) von deren Mitarbeiter(n) durchgeführt.

### 3.2.6 Bestimmung der Gushing Neigung des Malzes

Zur Bestimmung des Gushing Potentials der untersuchten Malzchargen wurde der modifizierte Carlsberg-Test (MCT) angewandt (Radau *et al.*, 1995; o.V., 1996). Auch diese Analyse wurde von Mitarbeiter(n) der Brauerei Kunde A in deren Labor durchgeführt.

## 4 Entwicklung und Evaluierung von PCR-Systemen

### 4.1 Strategie zur Entwicklung des Real-Time Multiplex PCR Assays

Die für das Detektionssystem der Schimmelpilze genutzte rDNA-Region ist auf Abschnitten der 18S und ITS des rDNA Genclusters situiert. Für Primer und Sonden geeignete Bereiche wurden anhand von Alignments bestimmt. Zunächst wurde dazu ein Sequenzvergleich der Zielkeime mit den genetisch und taxonomisch am nächsten verwandten Spezies, die nicht detektiert werden sollen, durchgeführt. Basierend auf dieser Analyse wurden verschiedene Sequenzbereiche ausgewählt, die sich aufgrund ihrer Struktur als Primer und Sonde eigneten.

Alle ausgewählten Oligonukleotide wurden im Anschluss unter Verwendung des IDT's Oligo Analyzer Version 3.0 einzeln auf die Parameter Annealingtemperatur, Self-Dimer und Hairpin hin untersucht. Self-Dimer bedeutet, dass der Primer eine komplementäre Struktur aufweist und sich aufgrund seiner Basenabfolge an sich selbst binden kann. Bei einem Hairpin bindet das 3'-Ende an das 5'-Ende des Primers. In beiden Fällen würde der Primer nicht mehr in vollem Umfang zur Amplifikation zur Verfügung stehen und unspezifische Artefakte bilden. Folglich wurde beim Vorliegen eines potentiellen Risikos für die Bildung eines Self-Dimers oder eines Hairpins das jeweilige Oligonukleotid für eine weitere Verwendung nicht in Betracht gezogen. Ferner wurde bei der Primerauswahl darauf geachtet, dass alle Primer in etwa die gleiche Annealingtemperatur aufweisen. Nach endgültiger Auswahl der Primer und Sonden wurden diese jeweils paarweise *in silico* auf Heterodimerbildung untersucht. Wenn an dieser Stelle ein potentielles Risiko festgestellt wurde, ist das betreffende Oligonukleotid neu ausgewählt worden.

Abschließend wurde das gesamte Detektionssystem mittels Nucleotide BLAST auf seine Spezifität geprüft. Dazu wurden die Sequenzen mittels *Search for short, nearly exact matches* gegen die Gesamtheit aller veröffentlichten Sequenzdaten abgeglichen. Nur wenn nach Auswertung des BLAST keine Kreuzreaktionen des gesamten Real-Time Multiplex PCR-Systems mit anderen, nicht zu den Zielorganismen gehörenden Keimen zu erwarten war, wurden die Primer und Sonden anhand von Praxisversuchen getestet.

## 4.2 Quantifizierung von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut

### 4.2.1 Vorstudie

Mit Hilfe des Real-Time Multiplex PCR Assays zur Quantifizierung von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut sollte es möglich sein, die beiden Schimmelpilze *Alternaria alternata* und *Phoma betae* jeweils spezifisch nachzuweisen. Damit das PCR-System dieses Kriterium erfüllen kann, war es zunächst notwendig, eine Literaturrecherche bezüglich der Keime durchzuführen, welche als potentielle Schädlinge der Zuckerrübe gelten (Mukhopadhyay, 1987; Benada *et al.*, 1987; Duffus und Ruppel, 1993). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Phytopathogene Pilze als Schädlinge der Zuckerrübe

| Organismus                              | Art des Befalls                   | Vorkommen                    |
|---|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>Alternaria tenuis / alternata</i>    | <i>Alternaria</i> -Blattbräune    | Blattkrankheit               |
| <i>Aphanomyces cochlioides</i>          | Wurzelbrand                       | Bodenbürtig                  |
| <i>Cercospora beticola</i>              | Blattfleckenkrankheit             | Blattkrankheit               |
| <i>Erysiphe betae</i>                   | echter Mehltau                    | Blattkrankheit               |
| <i>Fusarium oxysporum f.sp. betae</i>   | Umfallkrankheit                   | Bodenbürtig                  |
| <i>Helicobasidium purpureum</i>         | Rotfäule                          | Bodenbürtig                  |
| <i>Peronospora farinosa f.sp. betae</i> | falscher Rübenmehltau             | Blattkrankheit               |
| <i>Phoma betae</i>                      | Wurzelbrand/Blattfleckenkrankheit | samenbürtig / Blattkrankheit |
| <i>Phytophthora megasperma</i>          | Nassfäule                         | Blattkrankheit               |
| <i>Pythium ultimum</i>                  | Wurzelbrand                       | Bodenbürtig                  |
| <i>Ramularia beticola</i>               | Blattfleckenkrankheit             | Blattkrankheit               |
| <i>Rhizoctonia solani var. betae</i>    | Rhizoctonia-Fäule                 | Blattkrankheit               |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>               | Wurzelfäule                       | Bodenbürtig                  |
| <i>Uromyces betae</i>                   | Rübenrost                         | Blattkrankheit               |
| <i>Verticillium albo-artrum</i>         | Verticillium-Welke                | Bodenbürtig                  |

Alle veröffentlichten DNA-Sequenzen im Zielbereich (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) dieser, artverwandter und anderweitig relevanter Keime, wurden aus Datenbanken zusammengestellt und durch Alignments miteinander verglichen. Für Keime, deren Sequenz nicht verfügbar war, wurde eine Sequenz der am nächsten verwandten Art für den Sequenzvergleich herangezogen.

Von *Phoma betae* war bei Beginn dieser Arbeit noch keine DNA-Sequenz im Zielbereich bekannt bzw. veröffentlicht. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden DNA-Bereiche dieses Keims sequenziert (vgl. Abschnitt 3.2.3). Nach Auswertung der Sequenzdaten konnte festgestellt werden, dass eine spezifische Detektion von *Phoma betae* aufgrund der Basenabfolge in der rDNA-Region möglich sein sollte.

Anders gestaltete sich die Entwicklung des Detektionssystems zum Nachweis von *Alternaria alternata*. Die Analyse der Sequenzdaten verschiedener *Alternaria* Spezies ergab, dass einige Vertreter dieser Gattung im Bereich der rDNA-Region eine sehr homologe Basenabfolge aufweisen. Die Entwicklung eines spezifischen Assays ausschließlich für *Alternaria alternata*, mit dem alle nicht relevanten Spezies abgegrenzt werden können, erschien nicht möglich. Deshalb wurde in diesem Fall ein gruppenspezifisches Screeningsystem für *Alternaria* Spezies angestrebt. Dies wird separat in Abschnitt 7.1.1.2 begründet.

Um die einzelnen hier untersuchten Proben quantitativ miteinander vergleichbar zu machen, musste die Effizienz der DNA-Isolierung mit berücksichtigt werden. Da gleichzeitig mit der DNA aus den beiden Schimmelpilzen auch DNA aus der zu analysierenden Pflanze, in diesem Fall der Zuckerrübe, mit isoliert wurde, sollte die gemessene Menge an Schimmelpilz-DNA auf die isolierte Menge von Zuckerrüben-DNA bezogen werden. Hierzu wurde ein Referenzgen aus der Zuckerrübe in dem gleichen PCR-Ansatz mit detektiert, in dem die Schimmelpilz-DNA gemessen wurde. Dieses PCR-System, welches auch als interner Standard angesehen werden kann, wurde nicht in dieser Arbeit entwickelt, sondern von einem Projektpartner, der PLANTA AG, zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.2 Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe

In Tabelle 6 sind die Fluoreszenzfarbstoff-Markierungen der Reporter und Quencher der TaqMan™-Sonden sowie der zugehörige Zielorganismus und die jeweilige Nummer des Detektionsfilters angegeben.

Tabelle 6: Übersicht Fluoreszenzmarkierung der Sonden des Real-Time Multiplex PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an der Zuckerrübe

| Fluoreszenzfarbstoff |                      |                    |             |                      | Zielorganismus                      | Filter Nr. |
|----------------------|----------------------|--------------------|-------------|----------------------|-------------------------------------|------------|
| Reporter             |                      |                    | Quencher    |                      |                                     |            |
| Bezeichnung          | Absorption max. [nm] | Emission max. [nm] | Bezeichnung | Absorption max. [nm] |                                     |            |
| FAM                  | 494                  | 520                | BHQ 1       | 534                  | Nachweis <i>Phoma betae</i>         | 1          |
| HEX                  | 535                  | 556                | BHQ 1       | 534                  | Screening <i>Alternaria</i> Spezies | 2          |
| BODIPY TMR           | 542                  | 574                | BHQ 2       | 579                  | Referenzgen aus der Zuckerrübe      | 3          |

Der im verwendeten RealTime PCR Thermocycler zusätzlich vorhandene Filter 4 ist durch den passiven Referenzfarbstoff ROX belegt, welcher im QuantiTect® Multiplex PCR Kit bereits enthalten und für die Auswertung der Messresultate nötig ist. Der Referenzfarbstoff ROX hat keinen Einfluss auf die PCR-Reaktion an sich, vielmehr dient er zur Normalisierung des "Reporter"-Signals während der Datenaufnahme. Dadurch können Fluoreszenzschwankungen ausgeglichen werden, die beispielsweise durch Volumenschwankungen beim Pipettieren des Reaktionsansatzes oder durch Randeffekte der für die PCR verwendeten Mikrotiterplatte entstehen können (Schild, 2003). Nach eigenen Erfahrungen war die Verwendung von ROX im Hinblick auf die Auswertung und Reproduzierbarkeit der Messdaten zwingend notwendig.

#### 4.2.3 Kalibrierung des Messgeräts

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe HEX und BODIPY-TMR sind vom Gerätehersteller nicht auf dem verwendeten Messgerät kalibriert. Ein Kalibrierungskit ist von Seiten des Geräteherstellers nicht verfügbar, allerdings kann die Kalibrierung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe vom Anwender selbst vorgenommen werden.

Die Kalibrierung von HEX und BODIPY-TMR erfolgte nach der Bedienungsanleitung des ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Thermocyclers sowie dem QIAGEN Supplementary Protocol (o.V., 2004b).

#### 4.2.4 Auswahl der Primer und Sonden

Für die Detektionssysteme der *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* wurden jeweils verschiedene mögliche Primer und Sonden anhand von Alignments ausgewählt. Anschließend wurden diese mittels Oligonucleotid BLAST und Oligoanalyzer getestet (vgl. Abschnitt 4.1).

In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die Daten des Real-Time Multiplex PCR-Systems zur Detektion von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut im Einzelnen angegeben.

Tabelle 7: Charakteristika des Detektionssystems zum Nachweis von *Alternaria* Spezies

| Oligo-nukleotid  | Name   | Länge [bp] | GC Gehalt [%] | Schmelzpunkt [°C] | Max. ΔG [kcal/mole] | Fragmentlänge [bp] |
|------------------|--|------------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Vorwärts-primer  | Alt_fp_V1  | 26         | 38,5          | 53,6              | -44,8               | 135                |
| Sonde            | Alt_probe_V2<br>[5'-Hex - 3'-BHQ1]                 | 30         | 43,3          | 60,3              | -55,0               |                    |
| Rückwärts-primer | Alt_rp_V3  | 23         | 43,5          | 53,6              | -39,7               |                    |
| Name             | Sequenz 5'-3'                                      |            |               |                   |                     |                    |
| Alt_fp_V1        | GGA GGG ATC ATT ACA CAA ATA TGA AG                 |            |               |                   |                     |                    |
| Alt_probe_V2     | HEX- TAC AGC CTT GCT GAA TTA TTC ACC CTT GTC -BHQ1 |            |               |                   |                     |                    |
| Alt_rp_V3        | GTT TAT GTT TGT CCT AGT GGT GG                     |            |               |                   |                     |                    |

Mit dieser Primer- und Sondenkombination werden nach BLAST Auswertung und *in silico* Analyse folgende *Alternaria* Spezies erfasst:

- |                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| (1) <i>Alternaria alternata</i>  | (2) <i>Alternaria arborescens</i> |
| (3) <i>Alternaria citri</i>      | (4) <i>Alternaria gaisen</i>      |
| (5) <i>Alternaria longipes</i>   | (6) <i>Alternaria mali</i>        |
| (7) <i>Alternaria tenuissima</i> |                                   |

Tabelle 8: Charakteristika des Detektionssystems zum Nachweis von *Phoma betae*

| Oligo-nukleotid     | Name   | Länge [bp] | GC Gehalt [%] | Schmelzpunkt [°C] | Max. ΔG [kcal/mole] | Fragmentlänge [bp] |
|---------------------|--|------------|---------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| Vorwärts-primer     | Pho_fp_V1                                    | 26         | 38,5          | 53,8              | -47,1               | 126                |
| Sonde               | Pho_probe_V2<br>[5'-FAM - 3'-BHQ1]           | 25         | 60,0          | 62,7              | -49,4               |                    |
| Rückwärts-primer    | Pho_rp_V4                                    | 20         | 50,0          | 53,8              | -39,2               |                    |
| Name                | Sequenz 5'-3'                                |            |               |                   |                     |                    |
| <i>Pho_fp_V1</i>    | CGG AAG GAT CAT TAC CAA TAT GAA AG           |            |               |                   |                     |                    |
| <i>Pho_probe_V2</i> | FAM- CTC GTG GCT CTA CTT CTG CCC CAT C -BHQ1 |            |               |                   |                     |                    |
| <i>Pho_rp_V4</i>    | CGT ACC CAT TGT TTC CTT GG                   |            |               |                   |                     |                    |

Die BLAST Auswertung dieser Primer- und Sondenkombination ergab, dass *Phoma betae* spezifisch erfasst wird. Kreuzreaktionen mit anderen Keimen sind nicht zu erwarten.

Die Oligonukleotidsequenzen des Real-Time PCR-Systems zur Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe (ZR) wurden vom Projektpartner zur Verfügung gestellt. Die Primer tragen die Bezeichnung RefGZR-F und RefGZR-R, die Sonde ist mit RefGZR\_probe\_V2 abgekürzt. Am 5'-Ende wurde die Sonde mit BODIPY-TMR markiert, das 3'-Ende erhielt einen Black Hole Quencher (BHQ2). Auf die Benennung weiterer Daten wird an dieser Stelle verzichtet, da diese Eigentum der PLANTA AG sind.



#### 4.2.5 Validierung des Real-Time Multiplex PCR Assays für Zuckerrüben-schädlinge

##### 4.2.5.1 Kontrolle der Primer zur Detektion des Referenzgens aus Zuckerrübe

Zu Beginn der Arbeiten standen lediglich zwei veröffentlichte DNA-Sequenzen zum Abgleich des PCR-Systems zur Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe zur Verfügung. Um sicherzustellen, dass dieser Genabschnitt sortenunabhängig nachgewiesen werden kann, wurde das Primerpaar zur Detektion des Referenzgens zunächst an 12 verschiedenen Zuckerrübensorten getestet. Damit sollte gewährleistet werden, dass sich der betrachtete Genabschnitt als Basis für die oben beschriebene Form der Quantifizierung in der Real-Time Multiplex PCR eignet.

Von der aus frischem Blattmaterial der einzelnen Zuckerrübensorten isolierten DNA wurden jeweils 2 µl mit einer Konzentration von 10 ng/µl als Template in einem Gesamtreaktionsansatz von 25 µl eingesetzt. Die Primerkonzentration von RefGZR-F und RefGZR-R betrug 300 nM je Primer. Als Master-Mix wurden 12,5 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Kit verwendet. Die Messung erfolgte nach dem in Abbildung 8 dargestellten Temperaturprofil 3.

Neben den zwölf Zuckerrübensorten wurden auch DNA-Isolate von *Alternaria alternata* und *Phoma betae* in der Konzentration von 10 ng/µl sowie Wasser als negative Kontrolle in Einzelansätzen mit PCR untersucht. Abbildung 9 zeigt ergänzend zu den Detektionskurven (A) die zugehörigen Schmelzkurven (B) der PCR-Produkte sowie die gemessenen Ct-Werte (C).

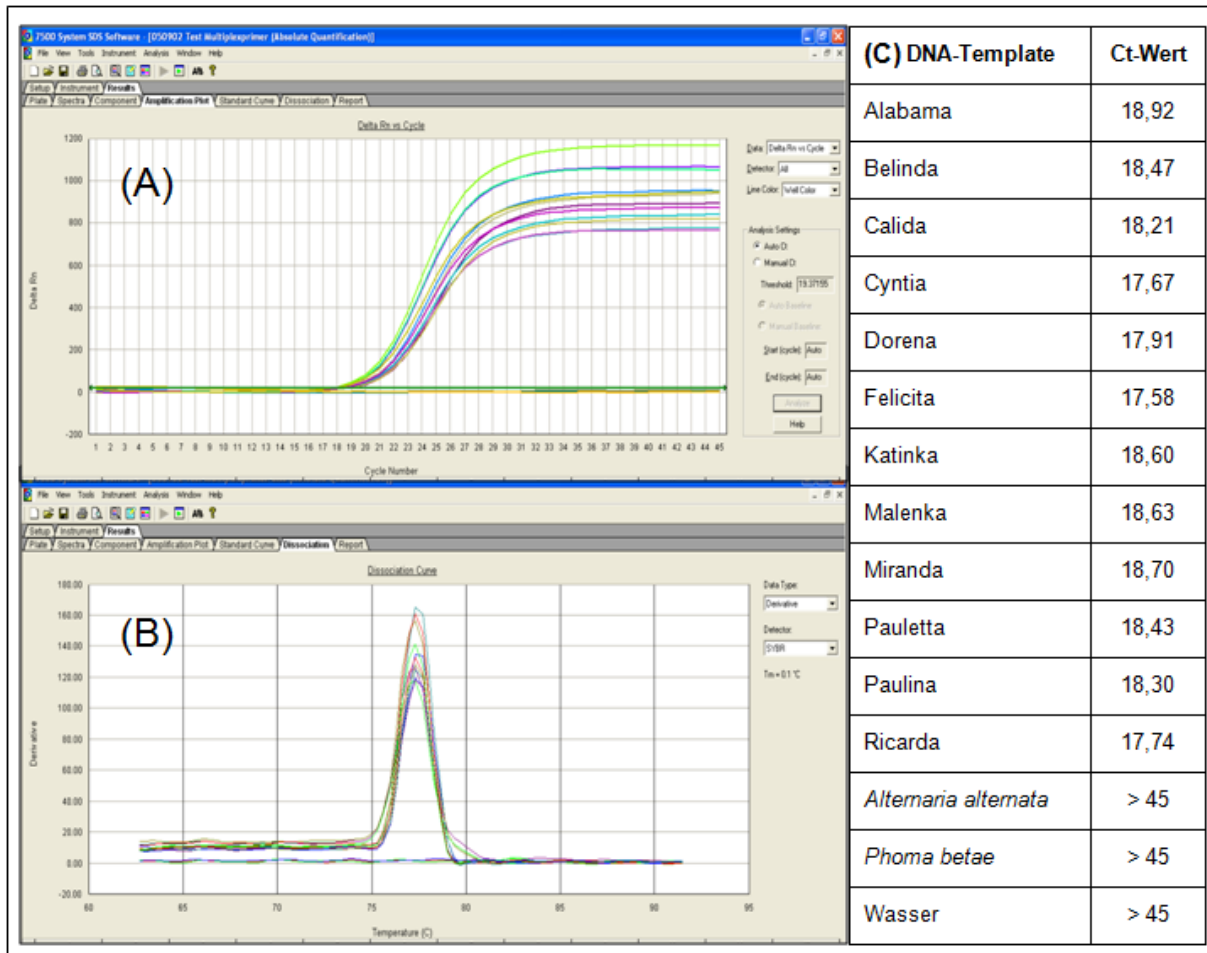


Abbildung 9: Detektionskurven (A) der untersuchten Zuckerrübensorten mit zugehörigen Ct-Werten (C) und Schmelzkurven (B)

Folgende Resultate ließen sich aus der Analyse der DNA-Isolate mit dem Primerpaar RefGZR-F und RefGZR-R ableiten:

1. Das Referenzgen konnte mit dem Primerpaar in allen Sorten einheitlich nachgewiesen werden.
2. Eine Inhibition der PCR trat in keinem Fall auf.
3. Das PCR-Produkt des Referenzgens aus der Zuckerrübe hatte einen Schmelzpunkt von ca.  $77,3^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .
4. Es trat keine Primerdimerbildung auf, das heißt bei der Schmelzkurvenanalyse wurde nur der spezifische Produktpeak detektiert, unspezifische Produkte in Form von kleineren Peaks unterhalb von  $77,3^{\circ}\text{C}$  wurden nicht festgestellt.

5. Eine Interaktion der Primer RefGZR-F und RefGZR-R mit der nachzuweisen- den Schimmelpilz-DNA konnte nicht festgestellt werden, da keine Detektions- reaktion bei *Alternaria alternata* DNA und *Phoma betae* DNA als PCR- Templates gemessen wurde.

4.2.5.2 Kontrolle der Primer zur Detektion der Zuckerrüben-Pathogene

Die ausgewählten Primer wurden in SYBR Green PCR-Ansätzen auf die folgenden beiden Kriterien hin überprüft:

- keine Interaktion der Primer mit der DNA der anderen ebenfalls im Real-Time Multiplex PCR-Detektionssystem nachzuweisenden Organismen
- keine Primerdimerbildung

Die Tests wurden nach dem in Tabelle 9 aufgeführten Schema durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl, wobei 12,5 µl QuantiTect® SYBR Green Master-Mix und 2 µl PCR-Template mit der DNA-Konzentration von 1 ng/µl eingesetzt wurden. Auch in diesem Versuch wurde das in Abbildung 8 dargestellte Temperaturprofil 3 verwendet.

Tabelle 9: Versuchsaufbau Test der Real-Time Multiplex PCR Primer mit SYBR Green I

| PCR System                          | Konzentration im PCR Ansatz [nM] |     | Ansatz 1  | Ansatz 2  | Ansatz 3  |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----|-----------|-----------|-----------|
| Detektion <i>Alternaria</i> Spezies | Vorwärtsprimer (5'-Primer)       | 300 | Alt_fp_V1 |           | Alt_fp_V1 |
|                                     | Rückwärtsprimer (3'-Primer)      | 300 | Alt_rp_V3 |           | Alt_rp_V3 |
| Detektion <i>Phoma betae</i>        | Vorwärtsprimer (5'-Primer)       | 300 |           | Pho_fp_V1 | Pho_fp_V1 |
|                                     | Rückwärtsprimer (3'-Primer)      | 300 |           | Pho_rp_V4 | Pho_rp_V4 |
| Detektion Referenzgen Zuckerrübe    | Vorwärtsprimer (5'-Primer)       | 300 |           |           | RefGZR-F  |
|                                     | Rückwärtsprimer (3'-Primer)      | 300 |           |           | RefGZR-R  |

Die Detektions- und Schmelzkurven der einzelnen Ansätze aus Tabelle 9 sind in Abbildung 10 dargestellt.

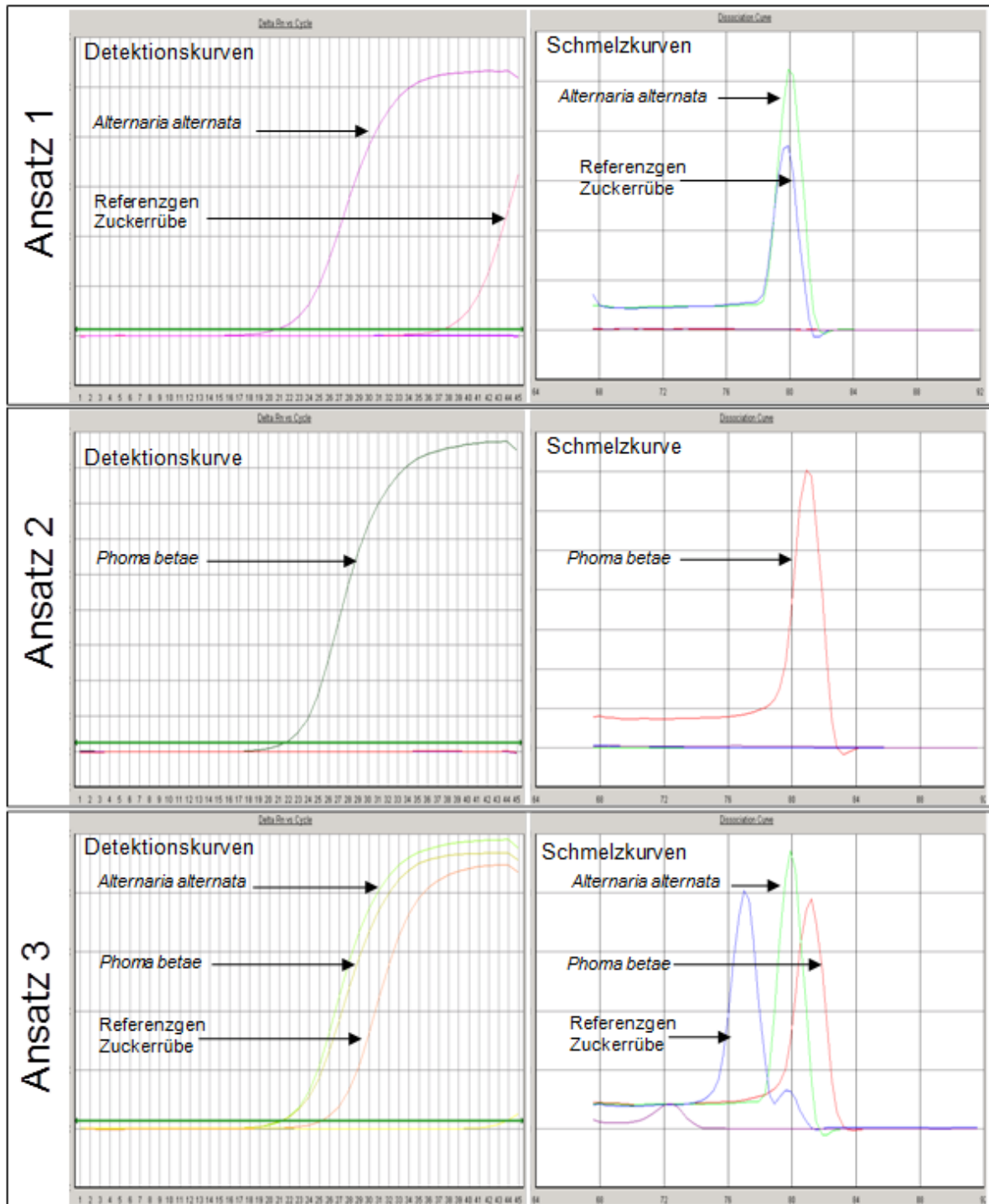


Abbildung 10: Detektions- und Schmelzkurven der Primertests zur Bestimmung der Spezifität für den Nachweis von *Alternaria* Spezies, *Phoma betae* und dem Referenzgen der Zuckerrübe in 3 einzelnen Ansätzen laut Tabelle 9

In Tabelle 10 bis Tabelle 12 sind jeweils die Auswertungen pro PCR-Ansatz mit den zugehörigen Messdaten aufgeführt.

Tabelle 10: Auswertung des Primertests zum Nachweis von *Alternaria* Spezies - Ansatz 1 -

| Template                    | cycle threshold |       | Schmelzpunkt [°C] |       | Auswertung  |
|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------|-------|---|
|                             | Wert            | Farbe | Temp. [°C]        | Farbe |   |
| <i>Phoma betae</i>          | >45             | --    | --                | --    | keine Interaktion festgestellt  |
| <i>Alternaria alternata</i> | 19,35           | lila  | 79,9              | grün  | wurde mit erwartetem Ct-Wert erfasst  |
| Cyntia                      | 35,95           | rot   | 79,9              | blau  | Die Detektionsreaktion war leicht positiv, obwohl ein negativer Wert erwartet wurde. Da der Peak der Schmelzkurve jedoch identisch mit dem des PCR-Produkts von <i>Alternaria alternata</i> war, konnte davon ausgegangen werden, dass hier eine tatsächliche, wenn auch nur schwache Belastung der Probe mit diesem Keim vorlag. |
| Wasser                      | >45             | --    | --                | --    | keine Primerdimerbildung festgestellt   |

Tabelle 11: Auswertung des Primertests zum Nachweis von *Phoma betae* - Ansatz 2 -

| Template                    | cycle threshold |       | Schmelzpunkt [°C] |       | Auswertung                            |
|-----------------------------|-----------------|-------|-------------------|-------|---------------------------------------|
|                             | Wert            | Farbe | Temp. [°C]        | Farbe |                                       |
| <i>Phoma betae</i>          | 20,55           | grün  | 80,9              | --    | wurde mit erwartetem Ct-Wert erfasst  |
| <i>Alternaria alternata</i> | >45             | --    | --                | --    | keine Interaktion festgestellt        |
| Cyntia                      | >45             | --    | --                | --    | keine Interaktion festgestellt        |
| Wasser                      | >45             | --    | --                | --    | keine Primerdimerbildung festgestellt |

Tabelle 12: Auswertung des Primertests zum Nachweis von *Alternaria alternata* und *Phoma betae* im Multiplexansatz - Ansatz 3 -

| Template                    | cycle threshold |           | Schmelzpunkt [°C]   |       | Auswertung   |
|-----------------------------|-----------------|-----------|---------------------|-------|--|
|                             | Wert            | Farbe     | Temp. [°C]          | Farbe |  |
| <i>Phoma betae</i>          | 19,93           | olivgrün  | 81,0                | rot   | wurde mit erwartetem Ct-Wert erfasst, keine Beeinflussung der Detektionsreaktion durch die beiden anderen Primersysteme  |
| <i>Alternaria alternata</i> | 19,82           | hell-grün | 79,9                | grün  | wurde mit erwartetem Ct-Wert erfasst, keine Beeinflussung der Detektionsreaktion durch die beiden anderen Primersysteme  |
| Cyntia                      | 23,95           | braun     | 77,3<br>und<br>79,9 | blau  | Nach Auswertung der Schmelzkurven wurde deutlich, dass zwei Detektionsreaktionen positiv sind:<br><ol style="list-style-type: none"> <li>1. Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe (hoher Peak bei 77,3 °C)</li> <li>2. Detektion von <i>Alternaria</i> Spezies (kleiner Peak bei 79,9°C)</li> </ol> Damit konnte die Beobachtung aus Ansatz 1, dass tatsächlich eine Belastung mit <i>Alternaria</i> vorliegt, bestätigt werden. |
| Wasser                      | 42,71           | gelb      | 72,5                | lila  | sehr schwache Primerdimerbildung, mit sehr niedrigem Verlauf der Schmelzkurve ⇒ stellt für die weitere Entwicklung des Real Time Multiplex PCR Systems kein Hindernis dar  |

Um die Vermutung zu überprüfen, dass am frischen Blattmaterial der Zuckerrübensorte Cyntia bereits eine geringe Belastung mit *Alternaria* Spezies vorlag, wurde diese nochmals unter sterilen Bedingungen analog zur Methode 3.2.1.2 angezchtet und eine zweite DNA-Isolierung durchgeführt. Nach dem Vermessen der DNA wurde diese auf 10 ng/µl eingestellt. Im Anschluss wurden 5 µl dieser DNA mit dem in Tabelle 13 zu entnehmenden Reaktionsansatz nach dem in Abbildung 10 dargestellten Temperaturprofil 2 analysiert. Untersucht wurden zwei parallele Ansätze des neuen Pflanzen-DNA-Isolats sowie 5 µl einer auf 1 ng/µl eingestellten *Alternaria alternata* DNA.

Tabelle 13: Zusammensetzung Reaktionsansatz Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis von *Phoma betae* und *Alternaria* Spezies am Zuckerrübensaatgut

| Bezeichnung                   | Konzentration Stammlösung | Konzentration im Mix | µl/Mix | Hersteller / Bezeichnung      |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------|--------|-------------------------------|
| H2O                           |                           |                      | 6,70   | Ampuwa                        |
| Master Mix                    | 2 x                       | 1 x                  | 15,00  | QuantiTect® Multiplex PCR Kit |
| Vorwärtsprimer 1 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Pho_fp_V1                     |
| Rückwärtsprimer 1 (3'-Primer) | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Pho_rp_V4                     |
| Sonde 1                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | Pho_probe_V2                  |
| Vorwärtsprimer 2 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Alt_fp_V1                     |
| Rückwärtsprimer 2 (3'-Primer) | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Alt_rp_V3                     |
| Sonde 2                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | Alt_probe_V2                  |
| Vorwärtsprimer 3 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGZR-F                      |
| Rückwärtsprimer 3 (3'-Primer) | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGZR-R                      |
| Sonde 3                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGZR_probe_V2               |

In der nachfolgenden Abbildung 11 sind die Detektionskurven der drei Reaktionsansätze dargestellt.

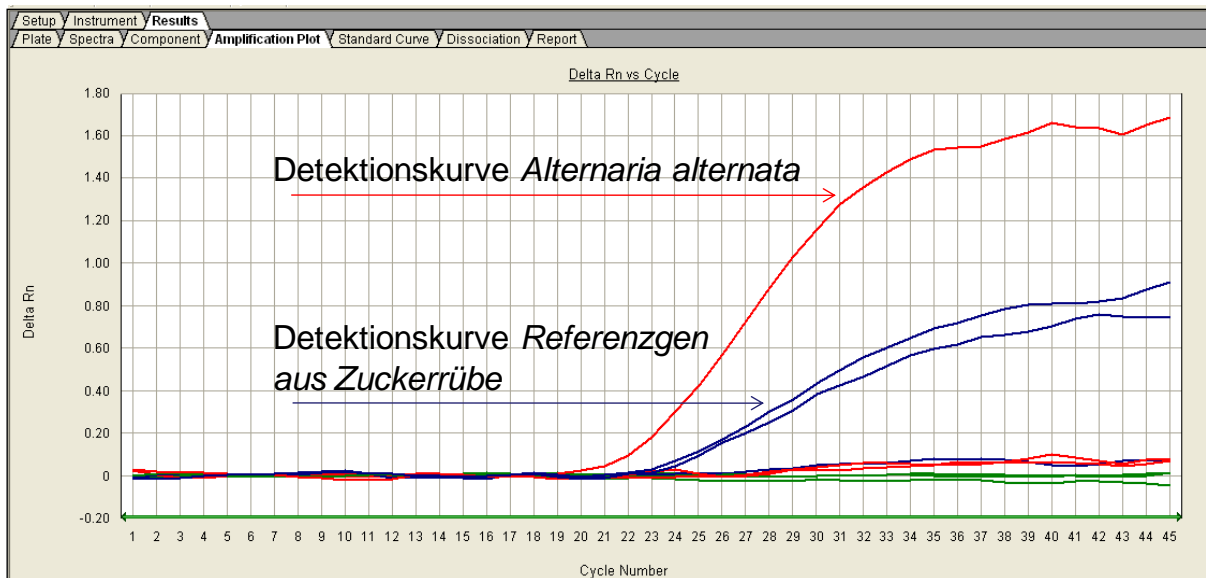


Abbildung 11: Kontrolle der Referenz-DNA aus der Zuckerrübenpflanzen Cyntia im Real-Time Multiplex PCR-Ansatz

Die rote Detektionskurve veranschaulicht die Amplifikation der DNA von *Alternaria alternata*, die beiden blauen Kurven zeigen die Vervielfältigung der Zuckerrüben-DNA. Neben den erwarteten positiven Reaktionen traten keine weiteren Detektionskurven auf, somit zeigte sich, dass an dem unter „sterilen“ Bedingungen angezogenem Pflanzenmaterial der Sorte Cyntia keine Spuren von *Alternaria* Spezies nachzuweisen waren. Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich diese Pflanzen-DNA verwendet.

#### 4.2.5.3 Ermittlung der Standardkurven

Zur Aufnahme von Standardkurven des Real-Time Multiplex PCR Assays wurde eine kombinierte, serielle Verdünnungsreihe von allen zu bestimmenden PCR-Targets hergestellt. Ausgehend von einer DNA-Mischung, welche jeweils 1,67 ng/µl DNA der beiden Zielkeime, *Alternaria alternata* und *Phoma betae*, sowie 16,67 ng/µl DNA der Zuckerrübensorte Cyntia enthielt, wurden logarithmisch in 10er Potenzen vier Verdünnungsstufen hergestellt. Die Verdünnung der DNA erfolgte in 5 mM Tris-HCl Puffer. Von allen Verdünnungsstufen wurden jeweils drei PCR-Ansätze parallel untersucht, wobei die Messung dreimal wiederholt wurde. In jede Real-Time Multiplex PCR wurden 5 µl der oben beschriebenen DNA-Mischungen eingesetzt, die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 13 zu entnehmen. Alle Reaktionen wurden nach dem in Abbildung 8 dargestellten Temperaturprofil 2 behandelt.

Die Messwerte jeder Verdünnungsstufe wurden gemittelt und über die logarithmierte DNA-Menge aufgetragen. Aus den jeweiligen Mittelwerten wurde eine Regressionsgerade sowie deren Regressionskoeffizient und Bestimmtheitsmaß  $R^2$  berechnet. Dies ist jeweils im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Der untere Teil der Abbildungen zeigt jeweils exemplarisch eine der drei durchgeführten Messungen der oben beschriebenen Verdünnungsreihe, das heißt die Detektionskurve sowie die zugehörige absolut eingesetzte DNA-Menge pro Ansatz. Alle Messdaten sind im Anhang A separat aufgeführt.



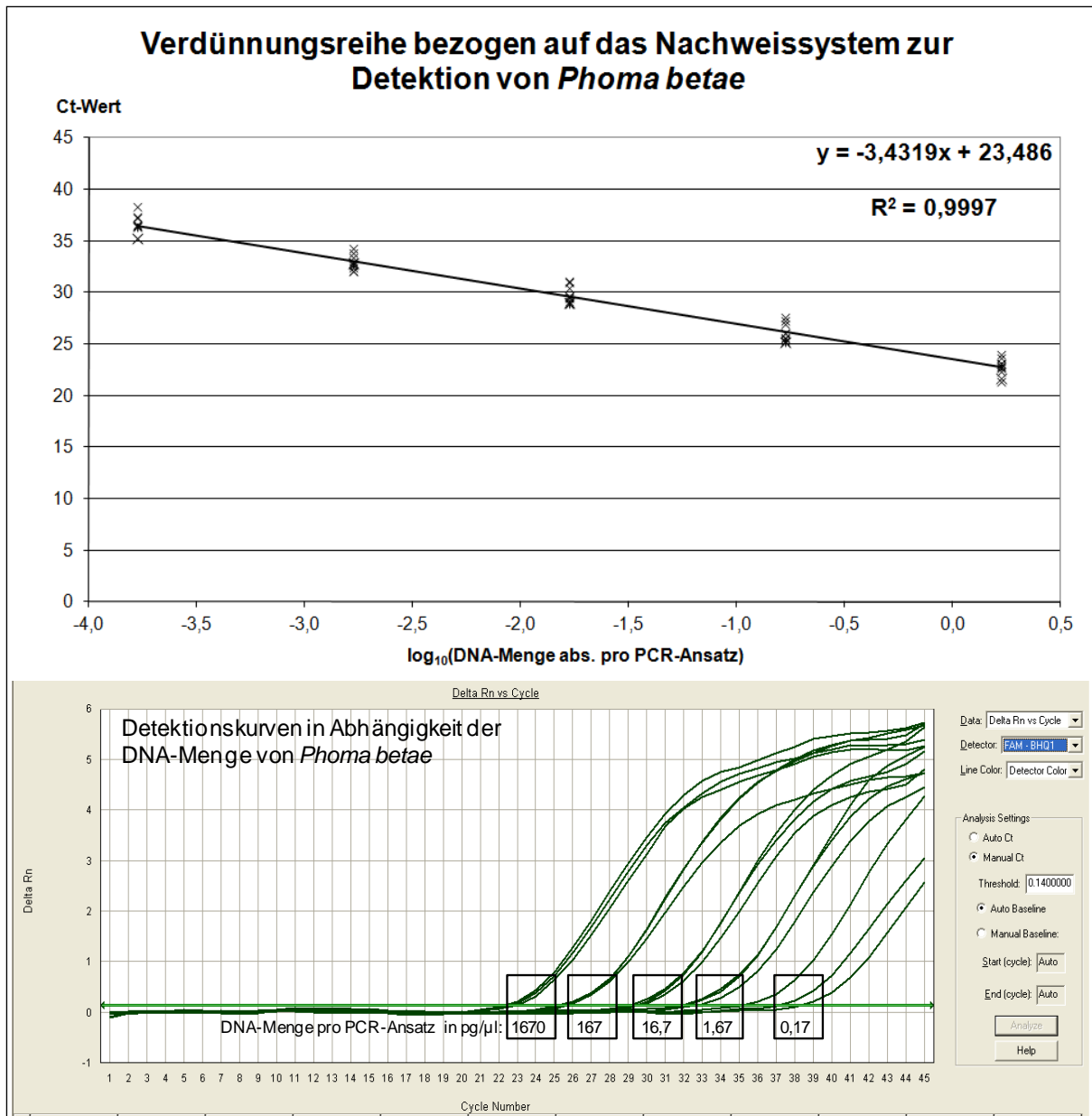


Abbildung 12: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von *Phoma betae* DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

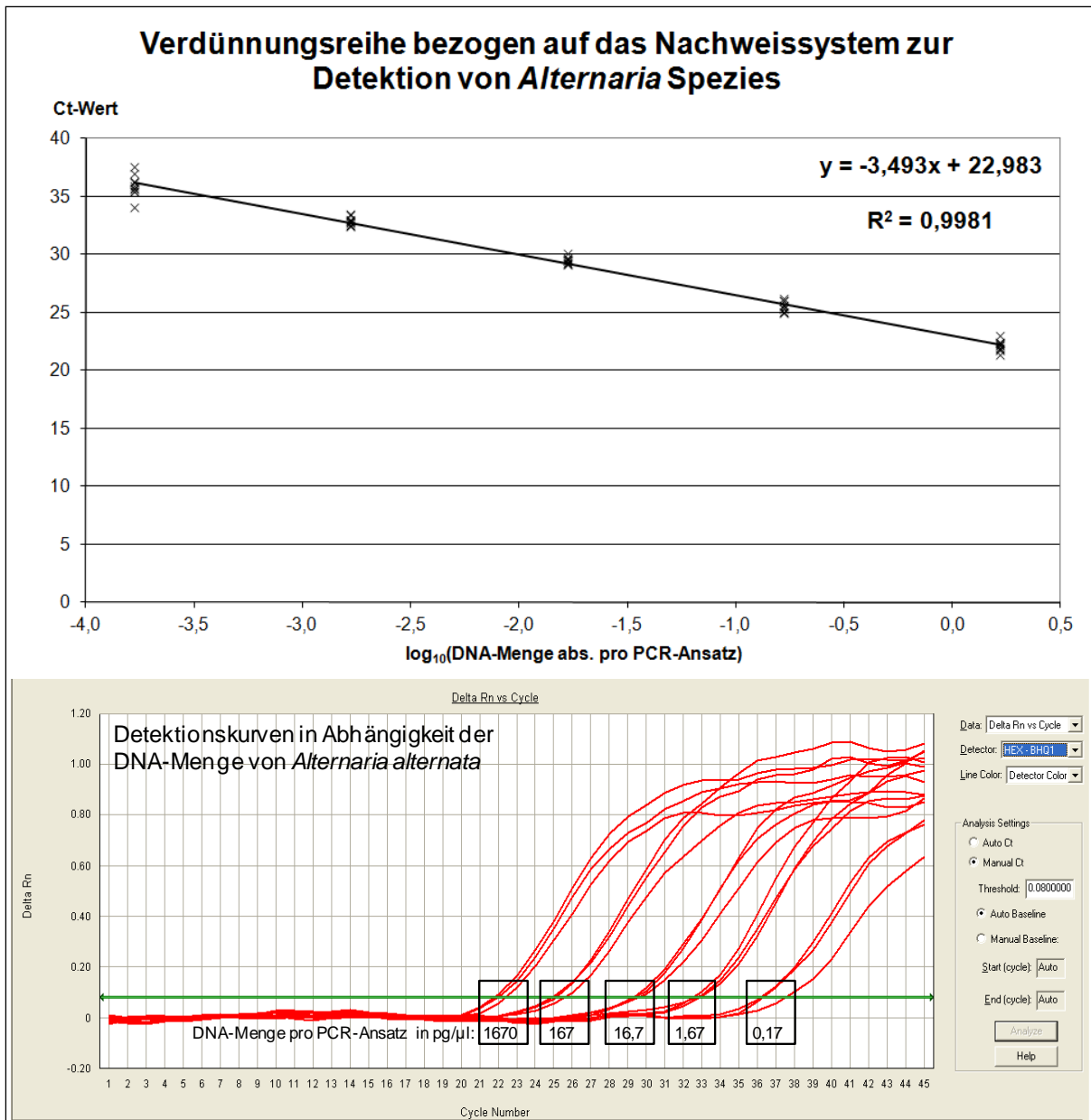


Abbildung 13: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von *Alternaria alternata* DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

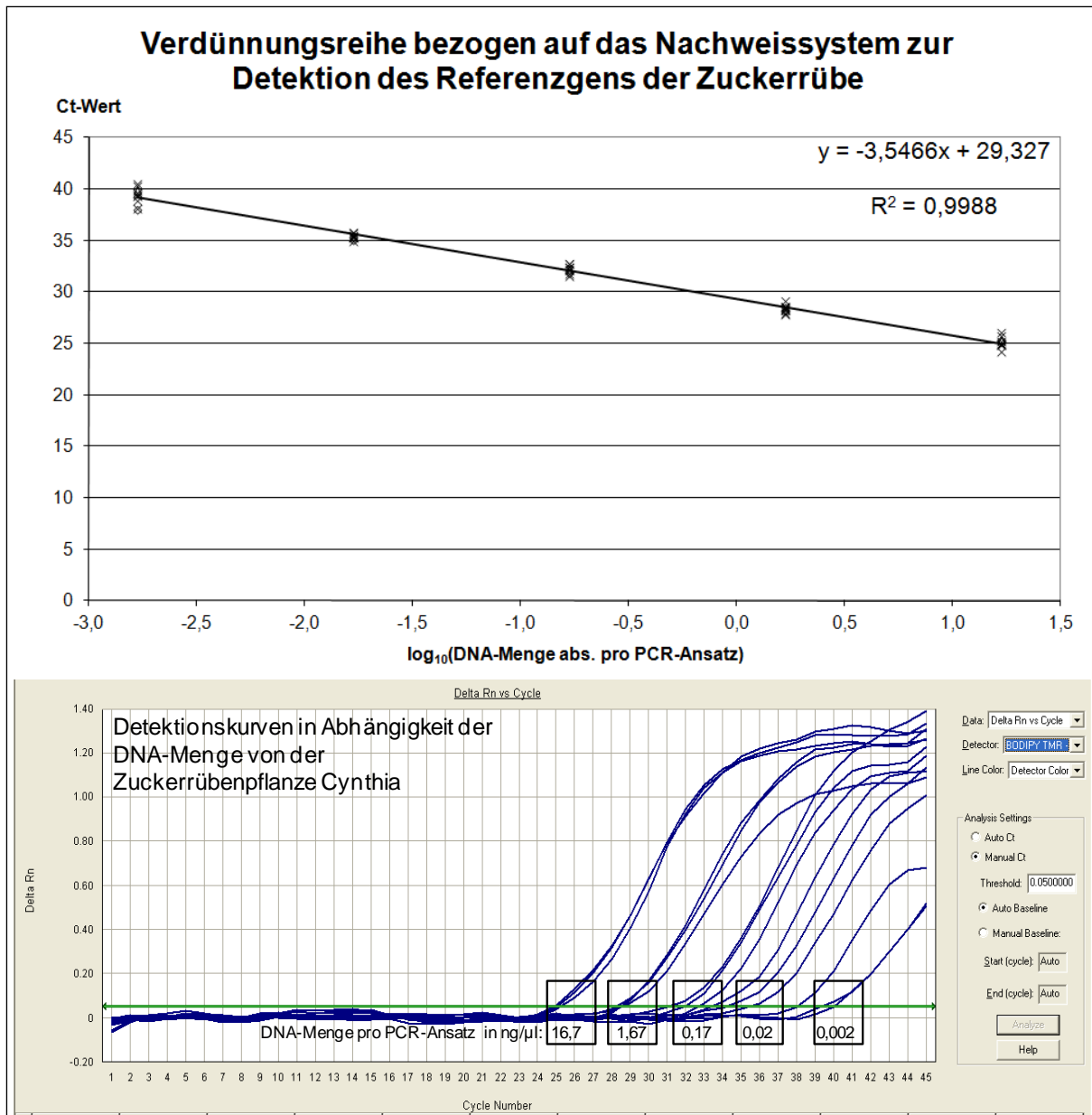


Abbildung 14: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von Zuckerrüben-DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

#### 4.2.5.4 Kreuzreaktionstest des PCR Assays für Zuckerrüben-Pathogene

Mit dem Kreuzreaktionstest wurde überprüft, ob mit dem Real-Time Multiplex PCR-System tatsächlich nur die DNA der Zielorganismen erfasst werden oder ob Nebenreaktionen mit anderen Mikroorganismen auftraten. Verwendet wurde DNA von Keimen, die das Saatgut der Zuckerrübe möglicherweise während der Vegetationsphase, Ernte oder Lagerung besiedeln. Diese können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den zu analysierenden Knäueln vorhanden sein, dürfen jedoch bei dieser PCR-Analyse nicht erfasst werden.

Für die Überprüfung der Kreuzreaktionen wurden 5 µl DNA der in Tabelle 14 gelisteten Mikroorganismen mit einer Konzentration von 1 ng/µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Alle unten aufgeführten DNA-Isolate wurden vor Verwendung geprüft, dass heißt wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben photometrisch vermessen und auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Ansonsten gilt für die Analyse die in Tabelle 13 aufgeführte Zusammensetzung je PCR-Ansatz und das in Abbildung 8 dargestellte Temperaturprofil 2. In Tabelle 14 sind die in der PCR gemessenen Ct-Werte je Keim aufgeführt, wobei die Messung einmal wiederholt wurde.

Tabelle 14: Auswertung des Kreuzreaktionstests zum Nachweis von Pathogenen am Zuckerrüben-saatgut

| Nr. | Keim                                   | Ct-Wert<br>Messung 1 | Ct-Wert<br>Messung 2 |
|-----|--|----------------------|----------------------|
| 1   | <i>Fusarium oxysporum f. sp. betae</i> | >45,0                | >45,0                |
| 2   | <i>Cercospora beticola</i>             | >45,0                | >45,0                |
| 3   | <i>Rhizoctonia solani var. betae</i>   | >45,0                | >45,0                |
| 4   | <i>Ramularia beticola</i>              | >45,0                | >45,0                |
| 5   | <i>Athelia rolfsii</i>                 | >45,0                | >45,0                |
| 6   | <i>Verticillium dahliae</i>            | >45,0                | >45,0                |
| 7   | <i>Arachniotus dankaliensis</i>        | >45,0                | >45,0                |
| 8   | <i>Epicoccum nigrum</i>                | >45,0                | >45,0                |
| 9   | <i>Cladosporium herbarum</i>           | >45,0                | >45,0                |
| 10  | <i>Rhizopus stolonifer</i>             | >45,0                | >45,0                |
| 11  | <i>Mucor plumbeus</i>                  | >45,0                | >45,0                |
| 12  | <i>Microdochium nivale v majus</i>     | >45,0                | >45,0                |
| 13  | <i>Fusarium graminearum</i>            | >45,0                | >45,0                |
| 14  | <i>Penicillium expansum</i>            | >45,0                | >45,0                |
| 15  | <i>Aspergillus niger</i>               | >45,0                | >45,0                |

| Nr. | Keim                            | Ct-Wert<br>Messung 1 | Ct-Wert<br>Messung 2 |
|-----|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| 16  | <i>Aureobasidium pullulans</i>  | >45,0                | >45,0                |
| 17  | <i>Humicola fuscoatra</i>       | >45,0                | >45,0                |
| 18  | <i>Trichoderma viride</i>       | >45,0                | >45,0                |
| 19  | <i>Trichoderma koningii</i>     | >45,0                | >45,0                |
| 20  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | >45,0                | >45,0                |
| 21  | <i>Rhodotorula glutinis</i>     | >45,0                | >45,0                |
| 22  | <i>Escherichia coli</i>         | >45,0                | >45,0                |
| 23  | <i>Micrococcus luteus</i>       | >45,0                | >45,0                |
| 24  | <i>Alternaria mali</i>          | 22,55                | 22,03                |
| 25  | <i>Alternaria alternata</i>     | 21,98                | 22,34                |
| 26  | <i>Phoma betae</i>              | 22,13                | 22,59                |
| 27  | Wasser                          | >45,0                | >45,0                |

#### 4.2.6 Ergebnisse der Validierung

##### 4.2.6.1 Linearität und Effizienz des Real-Time Multiplex Assays

Die Versuchsreihen zeigten, dass zwischen der eingesetzten DNA-Menge und dem gemessenen Ct-Wert der PCR-Nachweissysteme für die Schimmelpilze *Alternaria alternata* und *Phoma betae* sowie für das Referenzgen aus der Zuckerrübe jeweils ein linearer Zusammenhang bestand. Der ermittelte Regressionskoeffizient zwischen der DNA-Menge und dem Ct-Wert lag bei allen drei PCR-Systemen über 99,8 %.

Über den linearen mathematischen Zusammenhang zwischen eingesetzter DNA-Menge und korrespondierendem Ct-Wert konnten über die jeweilige Geradengleichung auch unbekannte DNA-Mengen aus dem Ct-Wert einer PCR-Reaktion bestimmt werden. In Tabelle 15 sind alle zum Nachweissystem gehörenden relevanten Parameter zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 15: Mathematische Parameter des Real-Time Multiplex PCR-Systems zum Nachweis von *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* an der Zuckerrübe

| Nachweissystem                 | Geradengleichung        | Gleichung zur Berechnung der DNA-Menge $X_0$ im Ausgangsprobenmaterial | Bstimmtheitsmaß $R^2$ | Effizienz des PCR-Systems [%] |
|--------------------------------|-------------------------|--|-----------------------|-------------------------------|
| <i>Alternaria</i> Spezies      | $y = -3,4930x + 22,983$ | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 22,983}{-3,4930}}$                           | 0,9981                | 93,32                         |
| <i>Phoma betae</i>             | $y = -3,4319x + 23,486$ | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 23,486}{-3,4319}}$                           | 0,9997                | 95,61                         |
| Referenzgen aus der Zuckerrübe | $y = -3,5466x + 29,327$ | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 29,327}{-3,5466}}$                           | 0,9988                | 91,41                         |

#### 4.2.6.2 Nachweisgrenzen

Anhand der Auswertung der Messungen der Verdünnungsreihen ließen sich die Nachweisgrenzen für die beiden Keime *Alternaria alternata* und *Phoma betae* im Real-Time Multiplex PCR-Ansatz bestimmen. Für beide Schimmelpilze lag die Nachweisgrenze bei 0,5 pg pro PCR-Ansatz. Zur Berechnung der Genomkopien wurde eine Genomgröße von 34 Mbp zu Grunde gelegt. Für beide Keime lagen die exakten Genomgrößen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit noch nicht vor. Im Falle von *Alternaria alternata* beruhte der Wert auf einer Schätzung nach Howlett *et al.* (2001), für *Phoma betae* wurde die Genomgröße der artverwandten Spezies *Leptosphaeria maculans* (anamorph = *Phoma lingam*) gewählt (Akamatsu, 2004). Nach Formel 2 konnte die Anzahl der Genomkopien bei gegebener DNA-Menge berechnet werden. Für *Alternaria alternata* und *Phoma betae* galt daher:

$$m = 34 \cdot 10^6 \text{ bp} \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}}$$

$$m = 3,7264 \cdot 10^{-2} \text{ pg}$$

$$\text{Anzahl der Genomkopien} = \frac{\text{Nachweisgrenze}}{m} = \frac{0,17 \text{ pg}}{3,7264 \cdot 10^{-2} \text{ pg}} \approx 4,47$$

Die theoretisch berechnete Nachweisgrenze lag somit sowohl für *Alternaria alternata* als auch für *Phoma betae* bei 5 Genomkopien pro PCR-Reaktionsansatz.

#### 4.2.6.3 Kreuzreaktionen

Mit dem Real-Time Multiplex PCR-System wurden ausschließlich die Zielorganismen erfasst. Mit den sonstigen getesteten Keimen traten keine messbaren Kreuzreaktionen auf (vgl. Tabelle 14).

#### 4.2.7 Berechnung der Belastungsindizes für Zuckerrüben-Pathogene

Ausgehend von den drei ermittelten Standardkurven konnte für jede Probe die Menge an DNA der Keimgruppe *Alternaria* Spezies sowie des Keims *Phoma betae* getrennt berechnet werden. Auch die Menge an Zuckerrüben-DNA wurde so ermittelt und diente als Basis für eine einheitliche Auswertung von Messdaten. Dazu wurde ein Belastungsindex eingeführt, welcher die Belastung von Schimmelpilz-DNA im Verhältnis zur Zuckerrüben-DNA angibt.

Da nach ersten Versuchen die Menge an Zuckerrüben-DNA in den meisten Fällen die Menge an DNA eines mikrobiologischen Kontaminanten um ein Vielfaches überstieg, wurden zur Vereinfachung der Auswertung die Menge an Kontaminanten-DNA mit dem Faktor 1.000 multipliziert.

Demnach errechnete sich der Belastungsindex für *Alternaria* Spezies, welcher im Folgenden mit  $BI_{AltSpe}$  abgekürzt wird, entsprechend Formel 3.

Formel 3: Berechnung des Belastungsindex für *Alternaria* Spezies

$$BI_{AltSpe} = \frac{\text{DNA } Alternaria \text{ Spezies [ng]}}{\text{Gesamt DNA Zuckerrübe [ng]}} \cdot 1.000$$

Analog dazu wurde der Belastungsindex für *Phoma betae* mit  $BI_{Phobet}$  bezeichnet. Die Berechnung ist in Formel 4 dargestellt.

Formel 4: Berechnung des Belastungsindex für *Phoma betae*

$$BI_{Phobet} = \frac{\text{DNA } Phoma \text{ betae [ng]}}{\text{Gesamt DNA Zuckerrübe [ng]}} \cdot 1.000$$

### 4.3 Quantifizierung von *Fusarium* Spezies an Braumalz

#### 4.3.1 Beschreibung des verwendeten Real-Time Multiplex PCR-Systems

Für den Nachweis von *Fusarium* Spezies an Braumalz wurde ein kommerziell erhältlicher PCR Kit (Screen *Fusarium* spec. in cereals) der Firma PIKA Weihenstephan GmbH verwendet. Dieser ist im Aufbau ähnlich zum dem im vorherigen Abschnitt entwickelten Real-Time Multiplex PCR-System. Mittels zweier unterschiedlicher Detektionsreaktionen wird einmal ein allgemeines Screening des Gesamtbesatzes an *Fusarium* Spezies durchgeführt, womit laut Herstellerangaben folgende Spezies erfasst werden:

- |                                |                                |                                  |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| (1) <i>F. acuminatum</i>       | (22) <i>F. fujikuroi</i>       | (43) <i>F. pseudoanthophilum</i> |
| (2) <i>F. acutatum</i>         | (23) <i>F. globosum</i>        | (44) <i>F. pseudocircinatum</i>  |
| (3) <i>F. annulatum</i>        | (24) <i>F. graminearum</i>     | (45) <i>F. pseudograminearum</i> |
| (4) <i>F. anthropilum</i>      | (25) <i>F. guttiforme</i>      | (46) <i>F. pseudonygamai</i>     |
| (5) <i>F. arthrosporioides</i> | (26) <i>F. incarnatum</i>      | (47) <i>F. pulverosum</i>        |
| (6) <i>F. avenaceum</i>        | (27) <i>F. inflexum</i>        | (48) <i>F. ramigenum</i>         |
| (7) <i>F. bactridioides</i>    | (28) <i>F. kyushuense</i>      | (49) <i>F. redolens</i>          |
| (8) <i>F. begoniae</i>         | (29) <i>F. lactis</i>          | (50) <i>F. robustum</i>          |
| (9) <i>F. beomiforme</i>       | (30) <i>F. langsethiae</i>     | (51) <i>F. sacchari</i>          |
| (10) <i>F. brevicatenuatum</i> | (31) <i>F. lateritium</i>      | (52) <i>F. sambucinum</i>        |
| (11) <i>F. buharicum</i>       | (32) <i>F. lunulosporum</i>    | (53) <i>F. sporotrichioides</i>  |
| (12) <i>F. bulbicola</i>       | (33) <i>F. mangiferae</i>      | (54) <i>F. sterilihyphosum</i>   |
| (13) <i>F. cerealis</i>        | (34) <i>F. napiforme</i>       | (55) <i>F. subglutinans</i>      |
| (14) <i>F. chlamydosporum</i>  | (35) <i>F. neoceras</i>        | (56) <i>F. sublunatum</i>        |
| (15) <i>F. coeruleum</i>       | (36) <i>F. nisikadoi</i>       | (57) <i>F. succisae</i>          |
| (16) <i>F. concentricum</i>    | (37) <i>F. nygamai</i>         | (58) <i>F. thapsinum</i>         |
| (17) <i>F. concolor</i>        | (38) <i>F. oxysporum</i>       | (59) <i>F. tricinctum</i>        |
| (18) <i>F. culmorum</i>        | (39) <i>F. phyllophilum</i>    | (60) <i>F. tumidum</i>           |
| (19) <i>F. denticulatum</i>    | (40) <i>F. poae</i>            | (61) <i>F. udum</i>              |
| (20) <i>F. dlaminii</i>        | (41) <i>F. polyphialidicum</i> | (62) <i>F. venenatum</i>         |
| (21) <i>F. equiseti</i>        | (42) <i>F. proliferatum</i>    | (63) <i>F. verticillioides</i>   |



Daneben wird durch eine zweite Detektionsreaktion eine ausgewählte Gruppe an *Fusarium* Spezies erfasst, die nachfolgend als Gruppe der starken Toxinbildner bezeichnet wird. Die Detektionsreaktion weist spezifisch folgende Spezies nach:

- (1) *F. cerealis* (syn. *F. crookwellense*, syn. *F. lunulosporum*)
- (2) *F. culmorum*
- (3) *F. graminearum*

Des Weiteren verfügt der Assay über eine interne Kontrolle als dritte Detektionsreaktion. Diese zeigt an, ob die DNA-Isolierung sowie die PCR-Reaktion an sich funktioniert haben, oder ob eine Inhibition der Reaktion vorlag. Dazu wird ein Referenzgen aus Weizen bzw. Gerste amplifiziert, welches in jedem Reaktionsansatz der hier untersuchten Fragestellung vorhanden sein muss.

In Tabelle 16 sind die Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen der TaqMan™-Sonden mit dem verwendeten Quencher sowie der zugehörige Zielorganismus und die jeweilige Nummer des Detektionsfilters im verwendeten Thermocycler angegeben.

Tabelle 16: Übersicht Fluoreszenzmarkierung der Sonden des Real-Time Multiplex Assays zum Nachweis von *Fusarium* Spezies an Braugetreide und Braumalz

| Fluoreszenzfarbstoff |                      |                    |             |                      | Zielorganismus                       | Filter Nr. |
|----------------------|----------------------|--------------------|-------------|----------------------|--------------------------------------|------------|
| Reporter             |                      |                    | Quencher    |                      |                                      |            |
| Bezeichnung          | Absorption max. [nm] | Emission max. [nm] | Bezeichnung | Absorption max. [nm] |                                      |            |
| FAM                  | 494                  | 520                | BHQ 1       | 534                  | Screening Gruppe starke Toxinbildner | 1          |
| HEX                  | 535                  | 556                | BHQ 1       | 534                  | Screening <i>Fusarium</i> Spezies    | 2          |
| BODIPY TMR           | 542                  | 574                | BHQ 2       | 579                  | Referenzgen aus Gerste und Weizen    | 3          |

Wie schon in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, ist auch in diesem Fall der im Gerät vorhandene vierte Filter für die Detektion von ROX reserviert

## 4.3.2 Validierung des Real-Time Multiplex PCR Assays

### 4.3.2.1 Ermittlung der Standardkurven

Zur Messung der Standardkurve wurde DNA von *Fusarium graminearum* verwendet, da dieser Keim einen Zielorganismus für den Screening Nachweis von *Fusarium* Spezies darstellte. Daneben musste die DNA auch mittels des Screening Systems „starke Toxinbildner“ amplifiziert werden. Zusätzlich wurde die *Fusarium graminearum* DNA jeweils einzeln mit der DNA beider Referenzsorten von Gersten- und Weizenmalz gemischt.

An dieser Stelle sollte außerdem untersucht werden, ob die DNA aus den verschiedenen Getreidesorten mit nahezu gleicher Effizienz amplifiziert wird. Dies war für die spätere Berechnung eines gemeinsamen und vergleichenden Belastungsindex von entscheidender Bedeutung.

Zur Aufnahme von Standardkurven des Real-Time Multiplex PCR Assays wurden vier kombinierte, serielle Verdünnungsreihen hergestellt. Ausgehend von einer DNA-Mischung, welche 2,5 ng DNA des Zielkeimes *Fusarium graminearum* sowie 125 ng DNA der jeweiligen Gersten- bzw. Weizensorte enthielt, wurden logarithmisch in 10er Potenzen vier Verdünnungsstufen hergestellt. Die Verdünnung der DNA erfolgte in 5 mM Tris-HCl Puffer. In jeden Ansatz der Real-Time Multiplex PCR wurden 5 µl der oben beschriebenen DNA-Mischungen eingesetzt. Die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 17 zu entnehmen. Alle Reaktionen wurden nach dem in Abbildung 8 dargestellten Temperaturprofil 2 analysiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung Real-Time Multiplex PCR-Reaktionsansatz zum differenzierten Screening von *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen

| Bezeichnung                   | Konzentration Stammlösung | Konzentration im Mix | µl/Mix | Hersteller / Bezeichnung      |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------|--------|-------------------------------|
| H2O                           |                           |                      | 6,70   | Ampuwa                        |
| Master Mix                    | 2 x                       | 1 x                  | 15,00  | QuantiTect® Multiplex PCR Kit |
| Vorwärtsprimer 1 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Fus_fp_V2                     |
| Rückwärtsprimer 1 (3'-Primer) | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Fus_scr_rp_V1                 |
| Sonde 1                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | Fus_scr_probe_V1              |
| Vorwärtsprimer 2 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Fus_cul_fp_V3                 |
| Rückwärtsprimer 2 (3'-Primer) | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45   | Fus_cul_rp_V3                 |
| Sonde 2                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | Fus_cul_probe_V3              |
| Vorwärtsprimer 3 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGBM_fp_V1                  |
| Rückwärtsprimer 3 (3'-Primer) | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGBM _rp_V2                 |
| Sonde 3                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30   | RefGBM_probe_V3               |

Zwischen den Ct-Werten der beiden Gersten- und Weizensorten traten keine wesentlichen Differenzen auf, woraus sich ableiten ließ, dass das gemeinsame Referenzgen sowohl aus Gerste als auch aus Weizen mit vergleichbarer Effizienz amplifiziert wird. Dies erlaubte wiederum, die gemessenen Ct-Werte sortenunabhängig zu mitteln und in einem gemeinsamen Diagramm über die logarithmierte DNA-Menge aufzutragen (vgl. Abbildung 15 bis Abbildung 17). Für die Messwerte der *Fusarium graminearum* DNA wurde analog vorgegangen.

Anhand der gemittelten Ct-Werte wurde für jedes PCR-System eine Regressionsgerade sowie das zugehörige Bestimmtheitsmaß berechnet. Der obere Teil der Abbildung zeigt alle vier ermittelten Messwerte der fünf Verdünnungsstufen mit der zugehörigen Regressionsgeraden sowie der Geradengleichung einschließlich des Regressionskoeffizienten. Darunter sind jeweils die Detektionskurven der Verdünnungsreihen dargestellt sowie die korrespondierende DNA-Menge pro Ansatz dargestellt. Alle Messdaten sind im Anhang B separat aufgeführt.

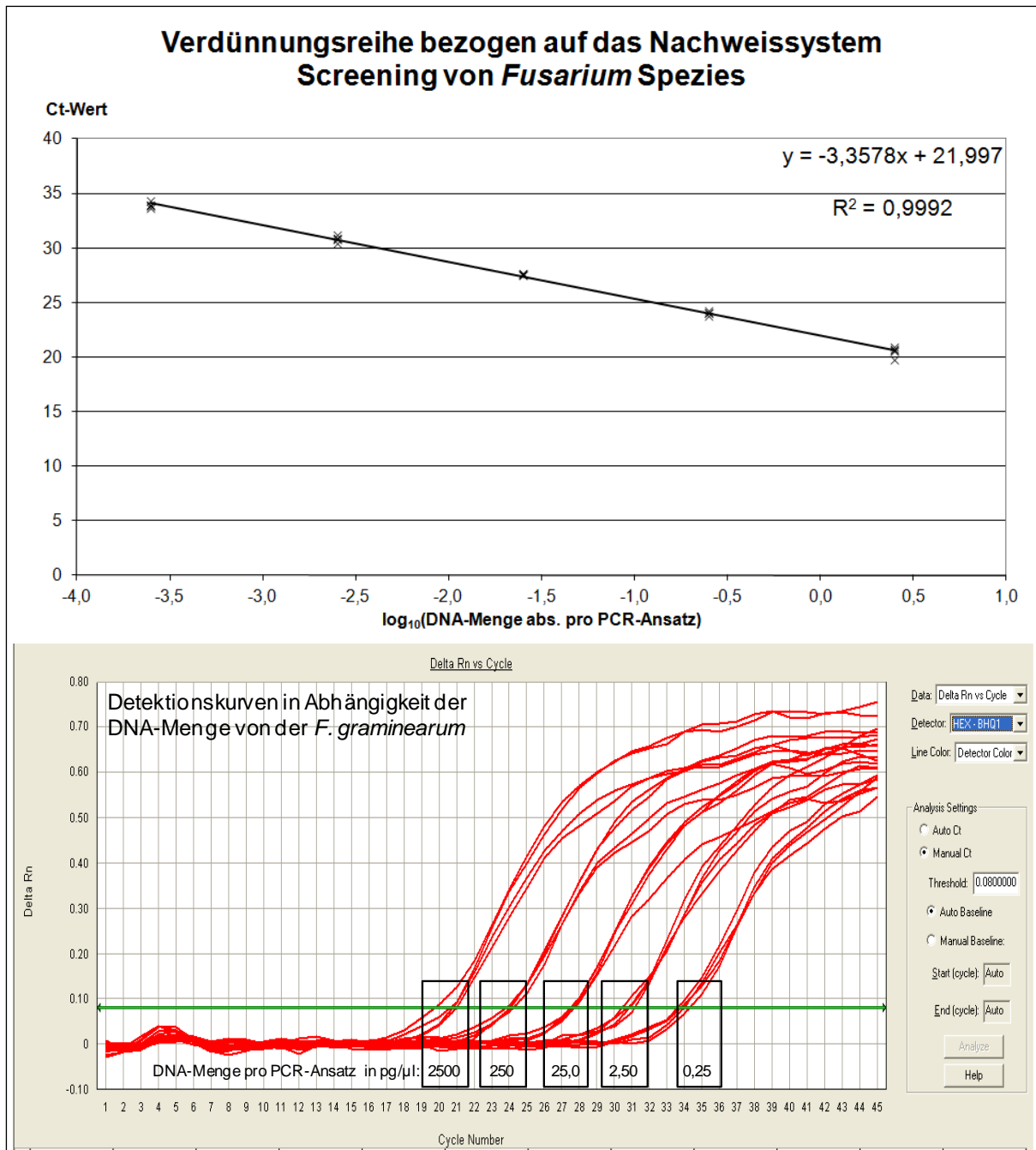


Abbildung 15: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von *Fusarium graminearum* DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

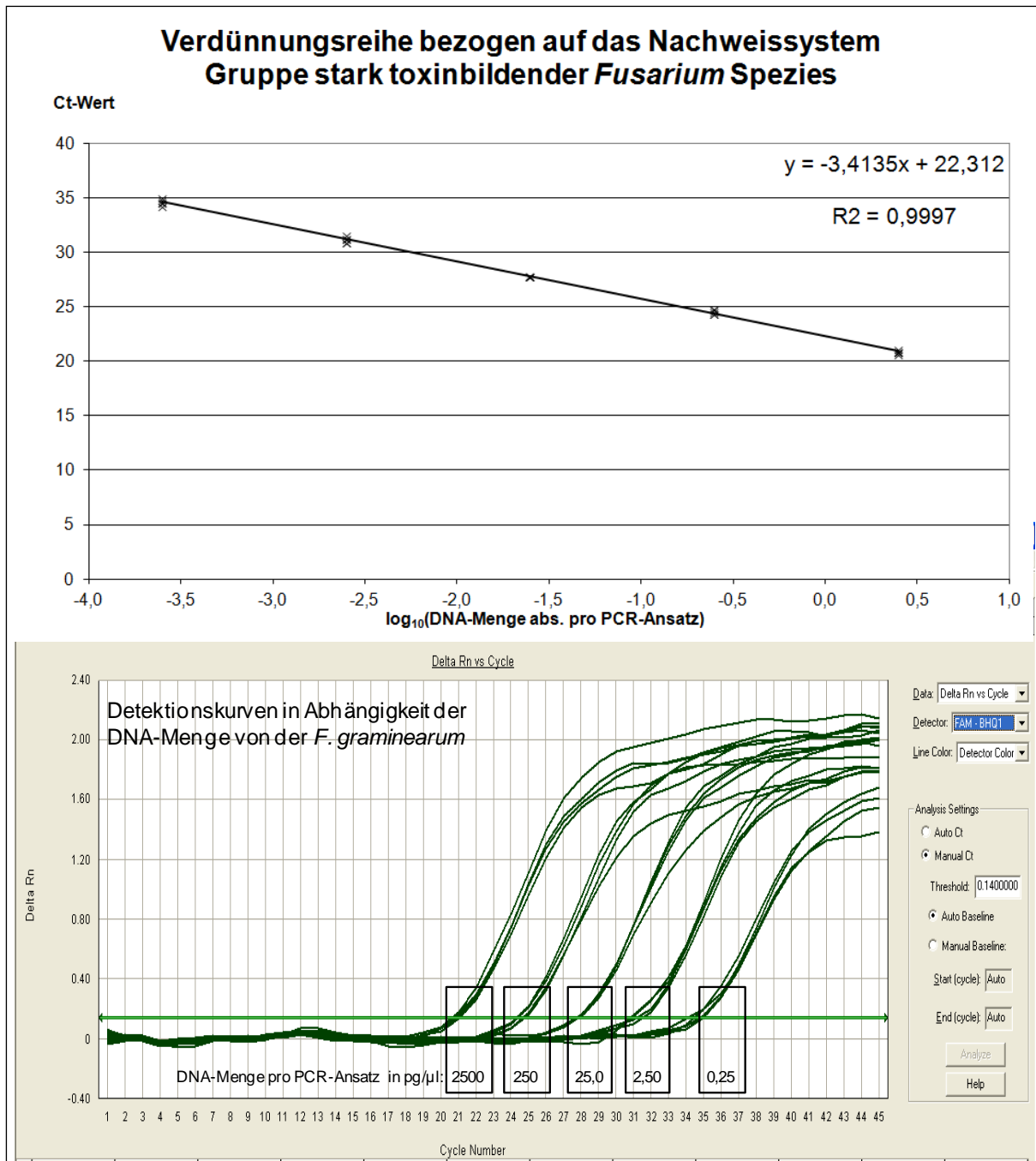


Abbildung 16: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von *Fusarium graminearum* DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

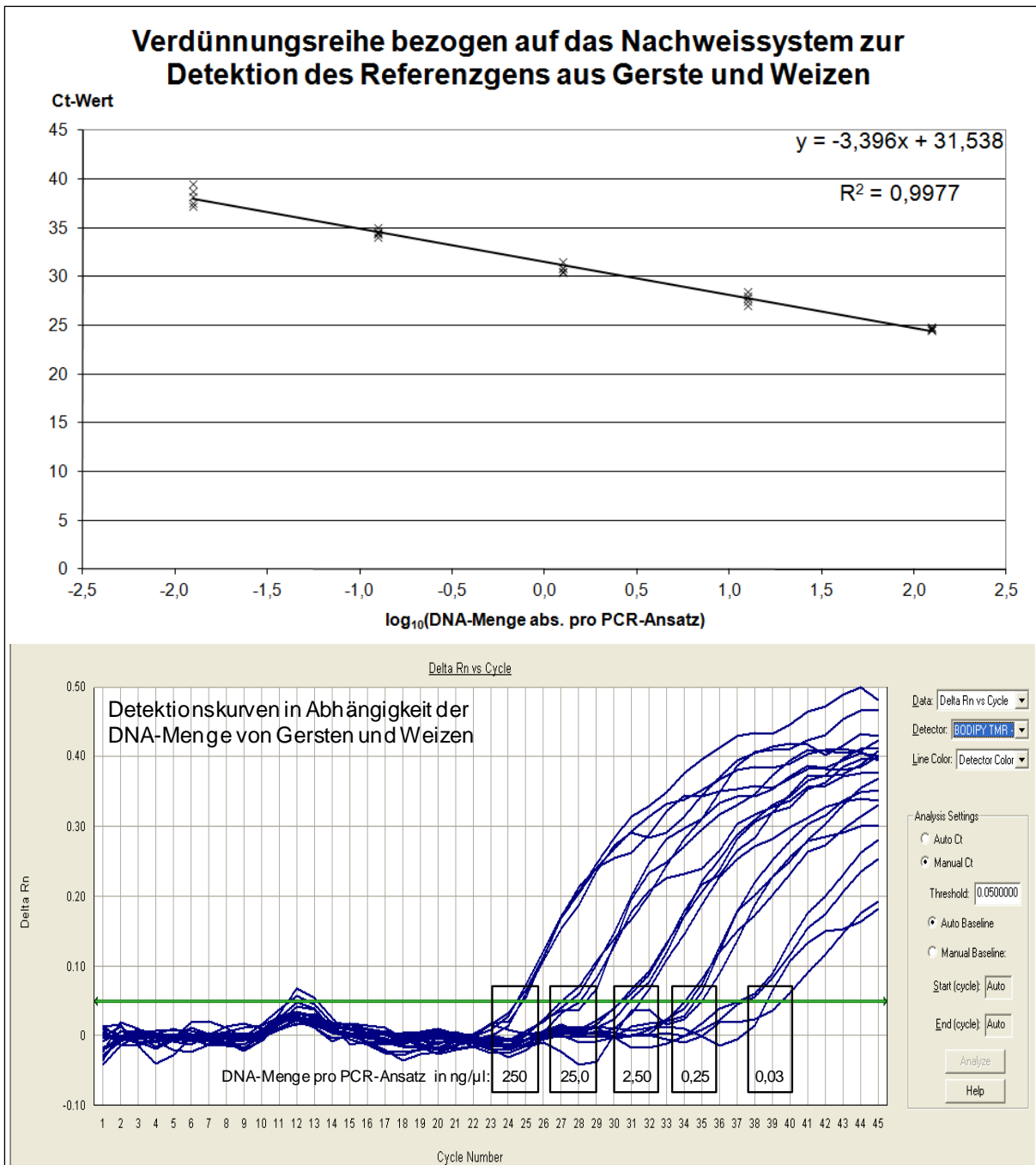


Abbildung 17: Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe aus einer 50:50 Mischung von Gersten- und Weizen-DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe

4.3.2.2 Kreuzreaktionstest

Auch an dieser Stelle sollte mit dem Kreuzreaktionstest überprüft werden, ob mit dem PCR-System tatsächlich nur die DNA der Zielorganismen erfasst wird oder ob Nebenreaktionen mit anderen Mikroorganismen auftreten. Verwendet wurde dazu DNA von Keimen, die als Feld- und Lagerflora von Gerste und Weizen auftreten. Des Weiteren wurde die DNA verschiedener *Fusarium* Spezies getestet, um nachzuweisen, dass diese mit dem Screening System erfasst werden. Gleichzeitig musste allerdings gewährleistet werden, dass nur die Spezies erfasst werden, die in die Gruppe starker Toxinbildner fallen.

Für die Überprüfung der Kreuzreaktionen wurden 5 µl DNA der in Tabelle 14 gelisteten Mikroorganismen mit einer Konzentration von 1 ng/µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Zudem sind in Tabelle 14 die gemessenen Ct-Werte je Keim aufgeführt, wobei die Messung einmal wiederholt wurde. Ansonsten gilt für die Analyse die in Tabelle 17 aufgeführte Zusammensetzung je PCR-Ansatz und das in Abbildung 8 dargestellte Temperaturprofil 2.

Tabelle 18: Auswertung des Kreuzreaktionstests zum Nachweis von Pathogenen an Getreide

| Nr. | Keim                             | Ct-Wert<br>Messung 1                    |                                     | Ct-Wert<br>Messung 2                    |                                     |
|-----|----------------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
|     |                                  | Screening<br><i>Fusarium</i><br>Spezies | Screening<br>starke<br>Toxinbildner | Screening<br><i>Fusarium</i><br>Spezies | Screening<br>starke<br>Toxinbildner |
| 1   | <i>Fusarium avenaceum</i>        | 20,51                                   | >45,0                               | 20,29                                   | >45,0                               |
| 2   | <i>Fusarium culmorum</i>         | 20,84                                   | 20,53                               | 20,22                                   | 20,74                               |
| 3   | <i>Fusarium equiseti</i>         | 20,96                                   | >45,0                               | 20,16                                   | >45,0                               |
| 4   | <i>Fusarium graminearum</i>      | 19,89                                   | 20,31                               | 20,01                                   | 19,99                               |
| 5   | <i>Fusarium oxysporum</i>        | 21,35                                   | >45,0                               | 21,07                                   | >45,0                               |
| 6   | <i>Fusarium poae</i>             | 20,03                                   | >45,0                               | 20,45                                   | >45,0                               |
| 7   | <i>Fusarium sambucinum</i>       | 22,16                                   | >45,0                               | 21,97                                   | >45,0                               |
| 8   | <i>Fusarium sporotrichioides</i> | 20,36                                   | >45,0                               | 20,11                                   | >45,0                               |
| 9   | <i>Fusarium tricinctum</i>       | 21,12                                   | >45,0                               | 20,88                                   | >45,0                               |
| 10  | <i>Fusarium solani</i>           | 35,66                                   | >45,0                               | 36,03                                   | >45,0                               |
| 11  | <i>Acremonium strictum</i>       | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 12  | <i>Alternaria alternata</i>      | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |

| Nr. | Keim                                 | Ct-Wert<br>Messung 1                    |                                     | Ct-Wert<br>Messung 2                    |                                     |
|-----|--------------------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
|     |                                      | Screening<br><i>Fusarium</i><br>Spezies | Screening<br>starke<br>Toxinbildner | Screening<br><i>Fusarium</i><br>Spezies | Screening<br>starke<br>Toxinbildner |
| 13  | <i>Arachniotus dankaliensis</i>      | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 14  | <i>Aspergillus niger</i>             | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 15  | <i>Athelia rolfsii</i>               | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 16  | <i>Aureobasidium pullulans</i>       | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 17  | <i>Botrytis cinerea</i>              | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 18  | <i>Byssochlamys fulva</i>            | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 19  | <i>Cercospora beticola</i>           | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 20  | <i>Chrysosporium keratinophilum</i>  | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 21  | <i>Cladosporium herbarum</i>         | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 22  | <i>Eppicoccum nigrum</i>             | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 23  | <i>Eupenicillium brefeldianum</i>    | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 24  | <i>Eurotium herbariorum</i>          | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 25  | <i>Humicola fuscoatra</i>            | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 26  | <i>Microdochium nivale v majus</i>   | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 27  | <i>Mucor mucedo</i>                  | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 28  | <i>Mucor plumbeus</i>                | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 29  | <i>Penicillium chrysogenum</i>       | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 30  | <i>Penicillium diversum</i>          | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 31  | <i>Penicillium verrucosum</i>        | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 32  | <i>Phoma betae</i>                   | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 33  | <i>Ramularia beticola</i>            | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 34  | <i>Rhizoctonia solani var. betae</i> | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 35  | <i>Rhizopus stolonifer</i>           | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 36  | <i>Trichoderma viride</i>            | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 37  | <i>Trichothecium roseum</i>          | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 38  | <i>Verticillium dahliae</i>          | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 39  | <i>Rodotorula glutines</i>           | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 40  | <i>Saccharomyces cerevisea</i>       | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 41  | <i>Escherichia coli</i>              | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 42  | <i>Micrococcus luteus</i>            | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |
| 43  | Wasser                               | >45,0                                   | >45,0                               | >45,0                                   | >45,0                               |



### 4.3.3 Ergebnisse der Validierung

#### 4.3.3.1 Linearität und Effizienz des Real-Time Multiplex PCR Assays

Um Linearität und Effizienz der PCR-Systeme zum Screening von *Fusarium* Spezies und zum Screening der Gruppe stark toxinbildender *Fusarium* Spezies zu prüfen, wurde wieder die DNA von *Fusarium graminearum* verwendet, da dieser Keim ein Vertreter beider Gruppen ist. Zur Bestimmung der beiden Parameter in Bezug auf das Referenzgen aus Gerste und Weizen wurde die DNA der beiden Gerstensorten Barke und Prestige sowie der beiden Weizensorten Hermann und Malto gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der DNA-Menge und dem gemessenen Ct-Wert in allen drei Fällen ein linearer Zusammenhang besteht. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß zwischen der DNA-Menge und dem Ct-Wert liegt dabei jeweils über 99,7 %.

Mit Hilfe des linearen mathematischen Zusammenhangs zwischen eingesetzter DNA-Menge und korrespondierendem Ct-Wert konnten über die jeweilige Geradengleichung auch unbekannte DNA-Mengen aus dem Ct-Wert einer PCR-Reaktion bestimmt werden. In Tabelle 19 sind alle zum Nachweissystem gehörenden relevanten Parameter aufgelistet.

Tabelle 19: Mathematische Parameter des Real-Time Multiplex PCR-Systems zum differentiellen Screening von *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen

| Nachweissystem                    | Geradengleichung        | Gleichung zur Berechnung der DNA-Menge $X_0$ im Ausgangsprobenmaterial | Bestimmtheitsmaß $R^2$ | Effizienz des PCR-Systems [%] |
|-----------------------------------|-------------------------|--|------------------------|-------------------------------|
| Screening <i>Fusarium</i> Spezies | $y = -3,3578x + 21,997$ | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 21,997}{-3,3578}}$                           | 0,9992                 | 98,52                         |
| Screening starke Toxinbildner     | $y = -3,4135x + 22,312$ | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 22,312}{-3,4135}}$                           | 0,9997                 | 96,32                         |
| Referenzgen aus Gerste und Weizen | $y = -3,396x + 31,358$  | $x_0 = 10^{\frac{CtWert - 31,358}{-3,396}}$                            | 0,9977                 | 97,00                         |

#### 4.3.3.2 Nachweisgrenzen

Anhand der Messdaten der Verdünnungsreihen ließ sich die Nachweisgrenze für *Fusarium graminearum* im Real-Time Multiplex PCR-Ansatz bestimmen. Diese lag bei beiden PCR-Systemen, sowohl Screening *Fusarium* Spezies als auch Screening starke Toxinbildner, bei 0,25 pg pro PCR-Ansatz. Zur Berechnung der Genomkopien wurde die Genomgröße von *Fusarium graminearum* mit ca. 38 Mbp zu Grunde gelegt (Goswami und Kistler, 2004). In Formel 2 ist der allgemeingültige Ansatz zur Berechnung der Anzahl der Genomkopien bei gegebener DNA-Menge dargestellt, bei der sich im speziellen Fall der *Fusarium* Spezies folgender Zusammenhang ergibt:

$$m = 38 \cdot 10^6 \text{ bp} \cdot 1,096 \cdot 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}}$$

$$m = 4,1648 \cdot 10^{-2} \text{ pg}$$

$$\text{Anzahl der Genomkopien} = \frac{\text{Nachweisgrenze}}{m} = \frac{0,25 \text{ pg}}{4,1648 \cdot 10^{-2} \text{ pg}} \approx 6,00$$

Die theoretisch berechnete Nachweisgrenze lag somit bei 6 Genomkopien von *Fusarium graminearum* pro PCR-Reaktionsansatz.

#### 4.3.3.3 Kreuzreaktionen

Mit dem Real-Time Multiplex PCR-System wurden ausschließlich die Zielorganismen erfasst. Mit den sonstigen getesteten Keimen traten keine messbaren Kreuzreaktionen auf (vgl. Tabelle 18).

#### 4.3.4 Berechnung der Belastungsindizes

Auch für die Auswertung von Messwerten mit diesem Real-Time Multiplex PCR-System bot sich die Einführung von Belastungsindizes an. Die Berechnungsgrundlagen dazu waren wiederum die ermittelten Standardkurven für die drei untersuchten Organismen. Von jeder Probe konnte über die gemessenen Ct-Werte die DNA-Menge der *Fusarium* Spezies, die der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies und die von Gerste oder Weizen in der ursprünglichen Probe berechnet werden.

Davon ausgehend wurde der Belastungsindex analog zu Abschnitt 4.2.7 bestimmt. Auch hier wurde die Schimmelpilz-DNA ins Verhältnis zur Gersten- bzw. Weizen-DNA gesetzt. Entsprechend der vorangegangenen Betrachtung bot es sich an, die Schimmelpilz-DNA mit dem Faktor 1.000 zu multiplizieren, da die Pflanzen-DNA im Normalfall die der Mikroorganismen um ein Vielfaches übersteigt.

Demnach errechnete sich der Belastungsindex für *Fusarium* Spezies, welcher im Folgenden mit  $BI_{FusGes}$  abgekürzt wurde, entsprechend Formel 5.

Formel 5: Belastungsindex *Fusarium* Spezies

$$BI_{FusGes} = \frac{\text{Gesamt DNA } Fusarium \text{ Spezies [ng]}}{\text{Gesamt DNA Gerste bzw. Weizen [ng]}} \cdot 1.000$$

Für die Gruppe der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies wurde der Belastungsindex mit  $BI_{FusTox}$  bezeichnet und errechnete sich wie in Formel 6 dargestellt.

Formel 6: Belastungsindex stark toxinbildender *Fusarium* Spezies

$$BI_{FusTox} = \frac{\text{Gesamt DNA stark toxinbildende } Fusarium \text{ Spezies [ng]}}{\text{Gesamt DNA Gerste bzw. Weizen [ng]}} \cdot 1.000$$

## 4.4 Optimierung der Real-Time Multiplex PCR-Reaktionen

### 4.4.1 Reaktionskomponenten des PCR-Ansatzes

Da in Real-Time Multiplex PCR-Ansätzen parallel mehrere Targets amplifiziert wurden, mussten die Reaktionskomponenten entsprechend auf diesen Sachverhalt abgestimmt werden. Dazu standen zum einen kommerzielle, speziell für diese Fragestellung entwickelte Master-Mixe zur Verfügung, welche bis auf Primer und Sonde alle Reaktionskomponenten enthalten, wie Polymerase, dNTPs, Magnesiumchlorid und evtl. Stabilisatoren. Zum anderen bestand aber auch die Möglichkeit, eine eigene Rezeptur für einen Master-Mix zu entwickeln. Dies war insbesondere aus kostentechnischer Sicht von Interesse, da der Preis für die Einzelkomponenten zumeist deutlich unter den Preisen eines fertig konfektionierten Reaktionsmixes lag. Dieser bewegte sich je nach Hersteller in einer Spanne von € 1,20 bis € 1,90 pro PCR-Ansatz. Als nachteilig war allerdings der wesentlich höhere Optimierungsaufwand anzusehen. Dennoch wurde die Idee aufgegriffen und Versuche diesbezüglich durchgeführt. Die ermittelten Resultate werden im Folgenden vorgestellt.

Für die Optimierung wurden unterschiedliche Alternativen getestet. Einerseits wurden verschiedene selbst hergestellte Mixe hinsichtlich ihrer PCR-Performance miteinander verglichen. Andererseits wurden zwei käuflich erworbene Master-Mixe auf dieses Kriterium hin geprüft. Als maßgebliche Parameter für die PCR-Performance wurden der gemessene Ct-Wert und die Höhe des normalisierten Reportersignals in Form des  $\Delta\text{-R}_n$ -Werts angesehen.

#### 4.4.1.1 Versuch 1: Test verschiedener Reaktionskomponenten im PCR-Ansatz

Zunächst wurden 6 Ansätze mit den in Tabelle 20 angegebenen Zusammensetzungen hergestellt. Grundlegend für die Auswahl und Konzentration der Reaktionskomponenten waren neben eigenen Erfahrungen verschiedene Veröffentlichungen bezüglich der Zusammensetzungen von Master-Mixen (Bustin und Nolan, 2004b; Grunenwald, 2003). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Gesamtreaktionsansatz.

Tabelle 20: Chemische Zusammensetzung verschiedener, eigen hergestellter PCR Master-Mixe der Versuchsreihe 1

| Setup                 | Ansatz 1 | Ansatz 2 | Ansatz 3 | Ansatz 4 | Ansatz 5 | Ansatz 6 |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Ammoniumsulfat [mM]   | -        | -        | -        | -        | 16       | 16       |
| Kaliumchlorid [mM]    | 50       | 50       | 50       | 50       | 50       | 50       |
| Magnesiumchlorid [mM] | 2,5      | 4,0      | 4,0      | 4,0      | 2,5      | 4,0      |
| dNTP [mM each]        | 0,2      | 0,2      | 0,4      | 0,2      | 0,20     | 0,4      |
| Tris-HCl [mM]         | 10       | 10       | 10       | 10       | 10       | 10       |
| Triton X-100 [%]      | 0,1      | 0,1      | 0,1      | 0,1      | 0,1      | 0,1      |
| Taq [U]               | 0,75     | 0,75     | 0,75     | 1,50     | 0,75     | 1,50     |

Untersucht wurden 5 µl DNA-Template einer mit *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* kontaminierten Saatgutprobe. Damit sollte sichergestellt werden, dass sich der Mix im Folgenden auch zur Untersuchung von Praxisproben eignet, da hier im Gegensatz zur aufgereinigten DNA der Stammkulturen eine veränderte Probenmatrix vorliegt. Eine negative Kontrolle wurde gesondert in einem zweiten Ansatz untersucht.

Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 30 µl, das Primer- und Sondensetup ist Tabelle 13 auf Seite 49 zu entnehmen. Das verwendete Temperaturprofil 1 ist in Abbildung 8 dargestellt.

Ziel des Versuchs war, die Variation einzelner Reaktionskomponenten im Hinblick auf die PCR-Performance zu untersuchen. In Abbildung 18 sind die einzelnen Detektionskurven dargestellt. Um eine bessere Übersicht zu wahren, sind in der linken Hälfte der Abbildung die Ansätze 1 bis 4 dargestellt, rechts finden sich die beiden Ansätze 5 und 6 mit Zusatz von Ammoniumsulfat. Der gleiche Ansatz hat in allen Graphiken jeweils die gleiche Farbgebung.

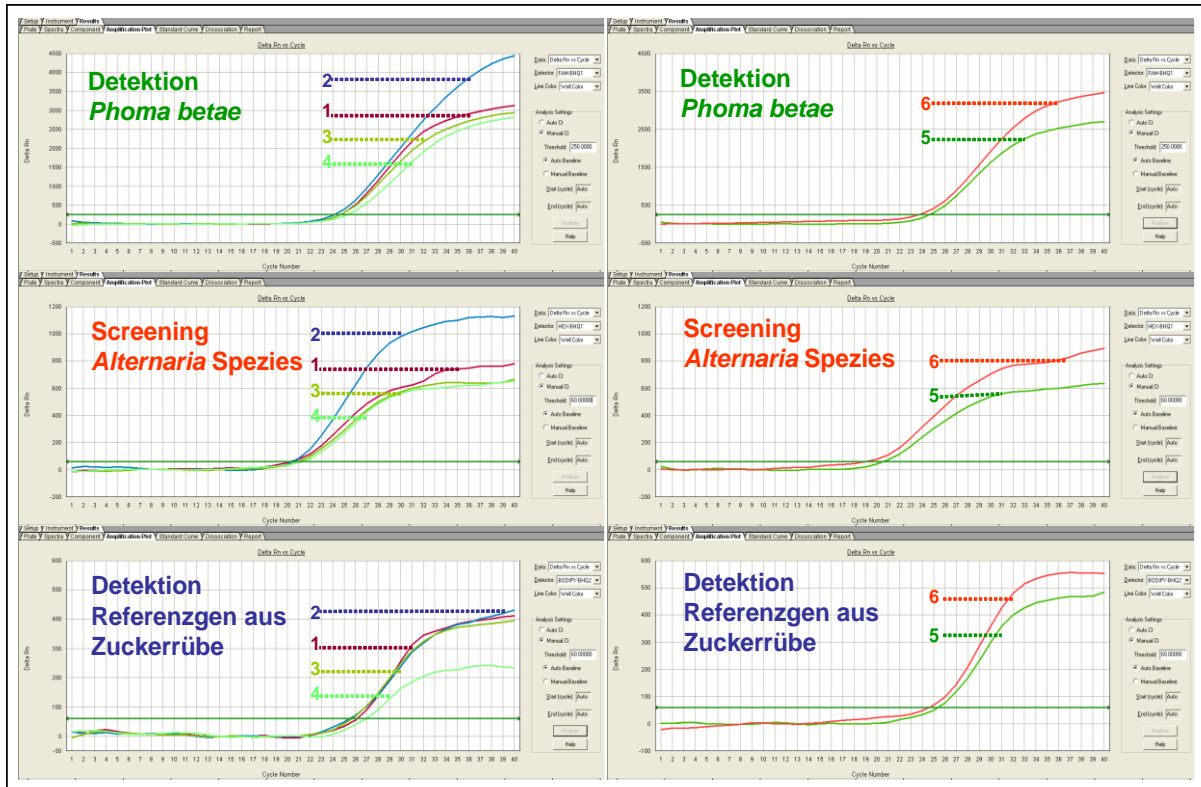


Abbildung 18: Detektionskurven 6 verschiedener Master-Mix Zusammensetzungen unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut, wobei die Nummerierung der einzelnen Ansätze Tabelle 20 entspricht

In der nachfolgenden Abbildung 19 wurden die ermittelten Ct-Werte der einzelnen Ansätze in Form von Balken aufgetragen. Die Farbauswahl folgte der Systematik, dass die Detektionskurven der Real-Time PCR Multiplex Anwendung den Farbstoff FAM in grün, die Sondenmarkierung HEX in rot und der Fluorophor BODIPY-TMR in blau darstellen. In den negativen Kontrollen wurde keine Detektionsreaktion gemessen, deshalb wurde auf die Darstellung verzichtet. Die Balken entsprechen den gemessenen Ct-Werten, die Rauten zeigen die zum Ansatz gehörige normalisierte Fluoreszenzausbeute, gemessen als  $\Delta\text{-R}_n$ -Wert. Da die gemessene Fluoreszenzausbeute des Farbstoffs FAM (Detektion von *Phoma betae*) aus technischen Gründen um ein Vielfaches höher berechnet wird als die der beiden Farbstoffe HEX und BODIPY-TMR, wurde dieser Wert durch 10 dividiert (vgl. bspw. Abbildung 18). Somit gestaltet sich die Abbildung übersichtlicher, da die Werte der Fluoreszenzausbeute für FAM auf der sekundären Ordinate in einem ähnlichen Größenbereich liegen wie die der Farbstoffe HEX und BODIPY-TMR.

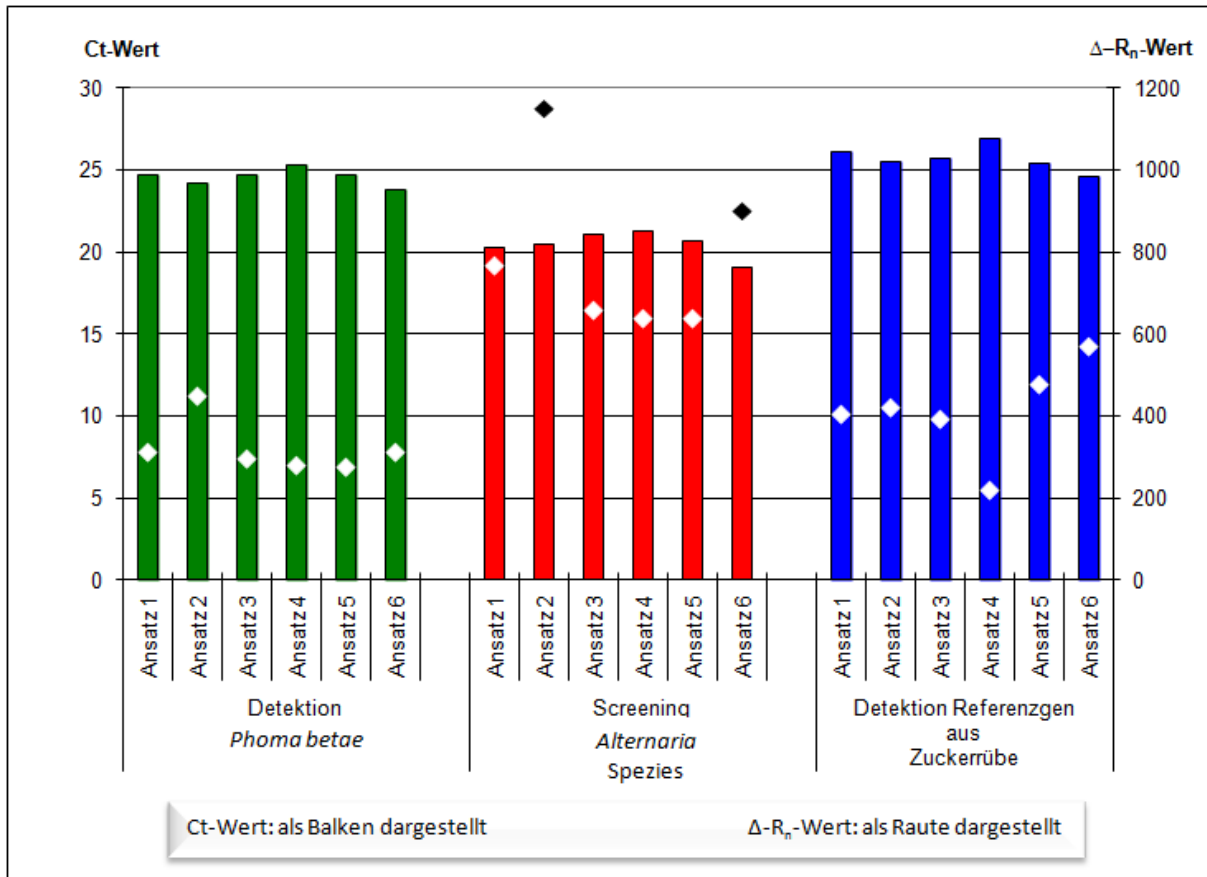


Abbildung 19: Ct-Wert und Fluoreszenzausbeute 6 verschiedener Master-Mix Zusammensetzungen unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut, wobei die Nummerierung der einzelnen Ansätze Tabelle 20 entspricht

Zunächst ließ sich feststellen, dass die gemessenen Ct-Werte der einzelnen Ansätze in Bezug auf die Detektion des jeweiligen Zielorganismus nur geringe Unterschiede aufwiesen, alle zugehörigen Daten sind im Anhang C dargestellt. Demgegenüber wurden erhebliche Differenzen in der Fluoreszenzausbeute deutlich. Der ideale Ansatz weist bei möglichst niedrigem Ct-Wert einen möglichst hohen  $\Delta$ -R<sub>n</sub>-Wert auf. Wie aus Abbildung 19 hervorging, konnte allerdings kein Ansatz beide Kriterien optimal erfüllen.

Augenscheinlich lieferten bei Gesamtbetrachtung der Analysenergebnisse die Ansätze 2 und 6 die besten Ergebnisse. Während in Ansatz 2 die Fluoreszenzausbeute bei der Detektion der beiden Pathogene signifikant höher ausfiel als in allen anderen Reaktionsansätzen, wurde unter Verwendung der Zusammensetzung in Ansatz 6 immer der niedrigste Ct-Wert gemessen. Zudem zeichnete sich Ansatz 6 durch die höchste Fluoreszenzausbeute für die Detektion der Zuckerrüben-DNA aus.

Prinzipiell konnten die sechs Ansätze in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die Ansätze 1 bis 4 enthielten kein Ammoniumsulfat, während es für Ansatz 5 und 6 in gleicher Konzentration (16 mM) verwendet wurde. Der Unterschied der beiden zuletzt genannten Ansätze lag in der dNTP- und Enzymkonzentration. Diese ist in Ansatz 6 im Vergleich zu Ansatz 5 jeweils doppelt so hoch. Offensichtlich führte dies hier zu niedrigeren Ct-Werten und einer höheren Fluoreszenzausbeute und somit insgesamt zur besseren Performance.

In der Gruppe ohne Ammoniumsulfatzusatz erzielte Ansatz 2 insgesamt die besten Resultate, welcher im Gegensatz zu Ansatz 1 eine etwas höhere Magnesiumchlorid-Konzentration enthielt. Ausgehend von dieser Reaktionszusammensetzung des Ansatzes 2 konnte sowohl durch Verdoppelung der dNTP Konzentration (Ansatz 3) als auch der Enzym-Konzentration (Ansatz 4) kein positiver Effekt auf die Untersuchungsparameter festgestellt werden. Eine ausschließliche Erhöhung der Enzym-Konzentration führte sogar zu den insgesamt schlechtesten Resultaten.

Abschließend wurden die beiden Ansätze 2 und 6 als Grundlage für eine weitere Optimierung verifiziert.

#### 4.4.1.2 Versuch 2: Variation verschiedener Reaktionskomponenten

Basierend auf den Erkenntnissen aus Versuch 1 wurden drei neue Master-Mixe hergestellt, deren Zusammensetzung in Tabelle 21 wiedergegeben ist. Alle weiteren Versuchsbedingungen wurden analog zu Versuch 1 gewählt.

Tabelle 21: Chemische Zusammensetzung verschiedener, eigen hergestellter PCR Master-Mixe der Versuchsreihe 2

| Setup                 | Ansatz 1 | Ansatz 2 | Ansatz 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| Ammoniumsulfat [mM]   | 16       | -        | -        |
| Kaliumchlorid [mM]    | 50       | 70       | 50       |
| Magnesiumchlorid [mM] | 4,0      | 4,0      | 4,0      |
| dNTP [mM each]        | 0,2      | 0,2      | 0,2      |
| Tris-HCl [mM]         | 10       | 10       | 10       |
| Triton X-100 [%]      | -        | -        | 0,2      |
| Taq [U]               | 0,75     | 0,75     | 0,75     |



Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 20 aufgeführt. Neben den Detektionskurven aller drei Nachweissysteme ist die graphische Aufarbeitung der Daten oben links in der Darstellung ergänzt. Auch hier geben die Balken den entsprechend gemessenen Ct-Wert wieder, und die markierten Punkte auf den Kurven zeigen den zugehörigen  $\Delta-R_n$ -Wert an. Im Anhang D finden sich die exakten Messwerte.

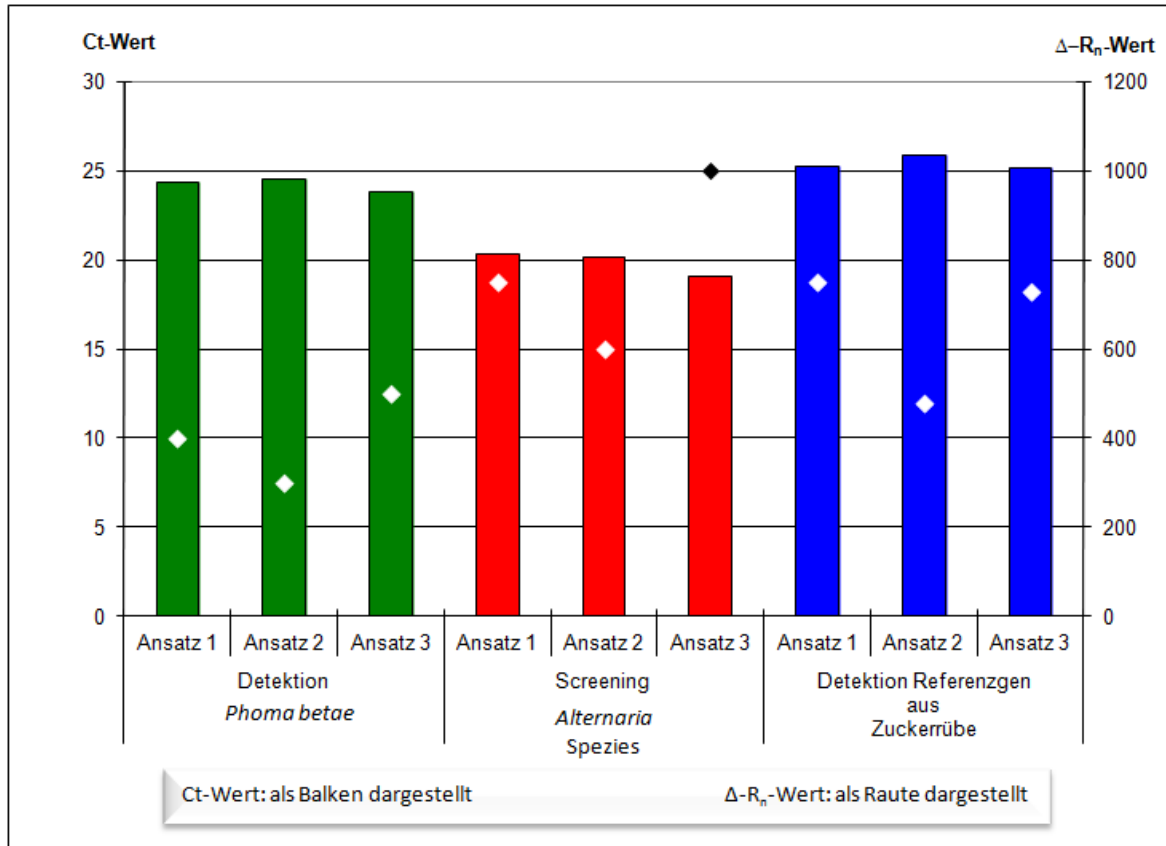


Abbildung 20: Ct-Wert und Fluoreszenzausbeute sowie zugehörige Detektionskurven aus dem Vergleich 3 optimierter Master-Mix-Zusammensetzungen unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut.

Das beste Resultat hinsichtlich Ct-Wert und Fluoreszenzausbeute bezüglich aller Nachweissysteme lieferte die Zusammenstellung in Ansatz 3. Ausgehend von der Rezeptur des Ansatzes 2 aus Versuch 1 wurde 0,2 mg/ml BSA hinzugefügt. Ein Anstieg des  $\Delta-R_n$ -Werts konnte ebenfalls durch die Halbierung der eingesetzten dNTP Konzentration in Ansatz 1 aus diesem Versuch im Vergleich zu Ansatz 6 Versuch 1 erzielt werden. Lediglich durch die Erhöhung der Kaliumchloridkonzentration in Ansatz 2 konnte keine Verbesserung der in Versuch 1 Ansatz 2 gemessenen Ct-Werte erzielt werden. Folglich schien Ansatz 3 aus dieser Versuchsreihe die ideale Zusammensetzung für eine Multiplexanwendung zu bieten, da hier die Vorteile einer hohen Fluoreszenzausbeute gepaart mit einem niedrigen Ct-Wert kombiniert wurden.

#### 4.4.1.3 Schlussfolgerungen aus Versuch 1 und Versuch 2

Die Variation der Magnesiumchlorid-Konzentration wird in den meisten Fällen zur Verbesserung der Performance von PCR-Systemen vorgeschlagen und ist aufgrund dessen auch ein vielfältiger Untersuchungsgegenstand. Wie aus verschiedenen Veröffentlichungen hervorgeht, wird ein Konzentrationsbereich von 4-6 mM als optimal angesehen (Eckert und Kunkel, 1990). Zu beachten ist allerdings, dass mit steigender Magnesiumchlorid-Konzentration das Risiko einer unspezifischen Produktbildung potentiell gefördert wird (Eckert und Kunkel, 1990). Für die Versuchsreihen konnte die Konzentration von 4 mM bestätigt werden, obwohl auch bei einer Konzentration von 2,5 mM keine gravierende Auswirkung auf die Performance festgestellt wurde.

Durch eine Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration wurde keine Verbesserung der PCR-Performance erzielt.

Eine Verdoppelung der Enzymkonzentration von 0,75 U auf 1,5 U (Versuch 1, Ansätze 4 und 6) bedeutet nicht zwingend einen positiven Effekt. Im Reaktionsansatz ohne Ammoniumsulfat (Versuch 1, Ansatz 4) verschlechterte sich die Performance sogar. Im geringeren Umfang konnte Gleiches auch für die dNTP Konzentration beobachtet werden.

Eine grundlegende Verbesserung stellte die Zugabe von BSA in den Reaktionsansatz dar. Bislang wurde BSA vornehmlich als Additiv verwendet, um PCR-Inhibitionen, ausgelöst durch Polyphenole oder Kationen wie Eisen, zu vermeiden (Kreder, 1996; Abu Al-Soud und Rådström, 2001). Ferner wird berichtet, dass BSA die Sensitivität des PCR Assays verbessert (Rudi *et al.*, 2004). Im vorliegenden Fall konnten sowohl die höchsten Fluoreszenzsausbeuten als auch die niedrigsten Ct-Werte bei der Verwendung von BSA im Reaktionsansatz gemessen werden.

#### 4.4.1.4 Versuch 3: Validierung des optimierten Reaktionsmixes

Abschließend wurde der in Versuch 2 als optimal befundene Ansatz 3 in Bezug auf die Nachweisgrenze und Reproduzierbarkeit einer Verdünnungsreihe getestet. Damit sollte ein direkter Vergleich zwischen kommerziellen und selbst hergestellten Mixen ermöglicht werden. Gemessen wurden zwei serielle Verdünnungsreihen ausgehend von einer Konzentration von 1 ng DNA/μl von *Alternaria alternata* bzw. von *Phoma betae*. Weiterhin war eine Verdünnungsreihe von DNA der Zuckerrübensorte Cyntia Untersuchungsgegenstand. Die erste Konzentrationsstufe der Zuckerrüben-DNA

enthielt 20 ng DNA/μl. Alle Ausgangskonzentrationen wurden in vier Stufen jeweils 1:10 verdünnt. In jeden Ansatz der Real-Time Multiplex PCR wurden 5 μl der oben beschriebenen DNA eingesetzt, die weitere Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 13 zu entnehmen. Alle Reaktionen wurden nach dem in Abbildung 8 dargestellten Temperaturprofil 2 analysiert. Die ermittelten Ct-Werte sowie die zugehörigen Detektionskurven sind in Abbildung 21 gezeigt.

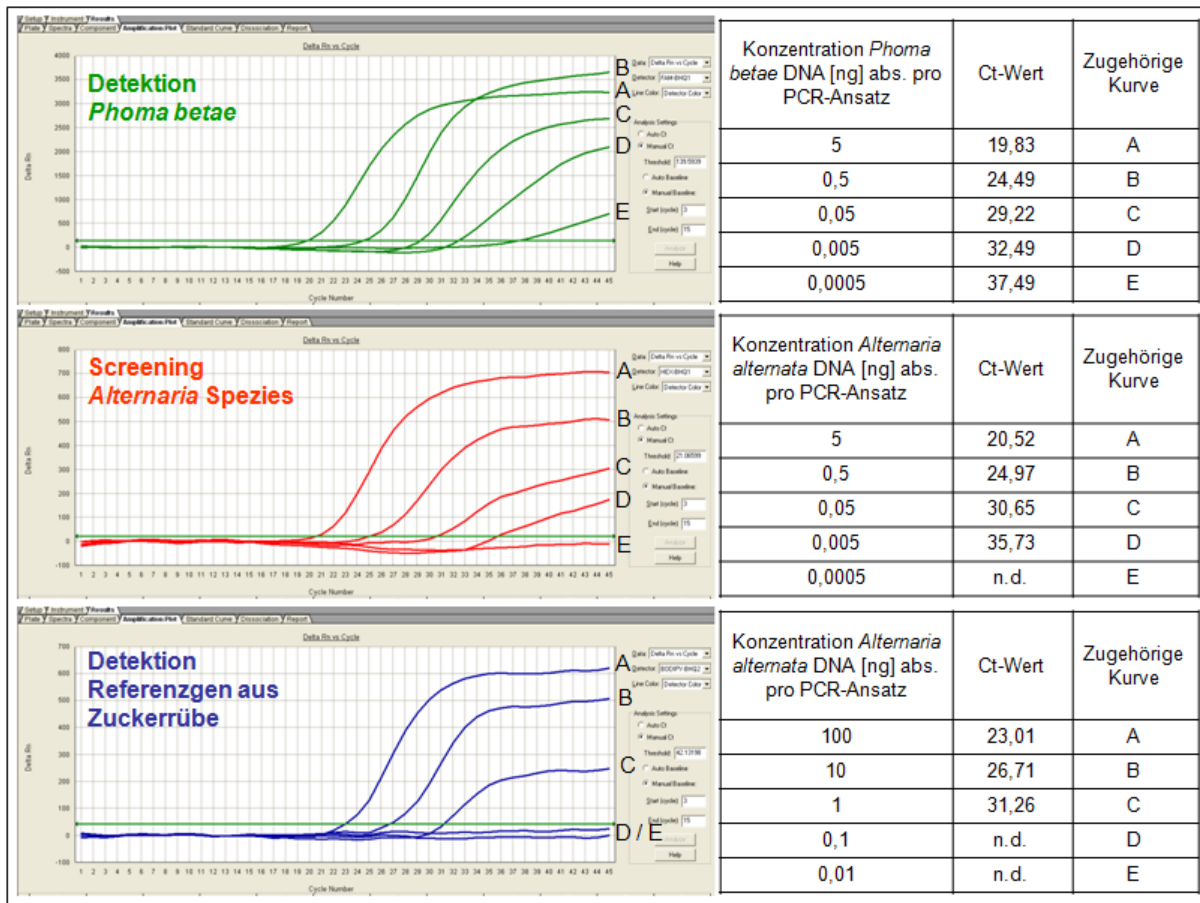


Abbildung 21: Detektionskurven und zugehörige Ct-Werte eines optimierten Master-Mix unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut in Bezug auf die Messung einer Verdünnungsreihe bestehend aus *Alternaria alternata*, *Phoma betae* und Zuckerrüben-DNA

Bei allen drei in Abbildung 21 dargestellten Detektionssystemen konnte eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzausbeute von der höchsten zur niedrigsten DNA-Konzentrationsstufe hin beobachtet werden. Mit abnehmender DNA-Konzentration sank bei allen drei Real-Time PCR Assays die Fluoreszenzausbeute. Diese war im Falle des Detektionssystems für *Alternaria* Spezies so groß, dass die letzte Verdünnungsstufe nicht mehr detektiert wurde. Bei der Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe waren sogar die beiden letzten Verdünnungsstufen von diesem Phänomen betroffen.

Zudem lag in allen Fällen ausgehend von der letzten detektierbaren zur vorhergehenden Verdünnungsstufe eine deutliche Zunahme des Abstands der Ct-Werte von über 4,5 Zyklen vor. Dieser Wert liegt im Idealfall konstant bei ca. 3,3 (vgl. Abschnitt 2.2.2.3).

#### 4.4.1.5 Schlussfolgerung aus der Optimierung selbst hergestellter PCR Master-Mix

Wie aus den Ergebnissen hervorging, eignete sich der Master-Mix aus eigener Herstellung nicht für die Verwendung im Real-Time Multiplex PCR-System. Gerade wenn ein PCR-Template in nur geringer Konzentration vorlag, konnte die Detektion nicht mehr gewährleistet werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise stehen die einzelnen Reaktionskomponenten noch nicht im idealen Verhältnis zueinander oder einzelne Konzentrationen sind zu niedrig oder zu hoch gewählt. Dies wäre allerdings nur durch aufwändige Versuchsreihen zu überprüfen gewesen.

Auch hätte sich womöglich durch die Zugabe weiterer Additive die PCR-Performance verbessern lassen. In diesem Zusammenhang wäre der Einsatz von DMSO zu nennen, welches die Amplifikation von G/C reichen Abschnitten verbessert (Jung *et al.*, 2001). Ähnliche Wirkung wird auch Betain zugeschrieben, das destabilisierend auf Sekundärstrukturen der DNA wirkt sowie die Spezifität der Primerbindung verbessern soll (Henke *et al.*, 1997).

Nicht zuletzt sollte auch die Qualität der Reaktionskomponenten bedacht werden. Gerade die gleichzeitige Amplifikation von mehreren Targets verlangt den Einsatz qualitativ höherwertiger Verbrauchsmaterialien. Während der Elongation des DNA-Strangs steigt beispielsweise der Gehalt an anorganischem Pyrophosphat im Reaktionsansatz. Durch speziell synthetisierte dNTPs kann der Anstieg von Pyrophosphat im Reaktionsansatz über den Verlauf der PCR-Zyklen vermieden werden. Ebenso wäre denkbar, dem PCR-Reaktionsansatz Pyrophosphatase zuzusetzen. Beides wirkt sich wiederum positiv auf die Aktivität der Polymerase aus und würde das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Produktbildung verschieben (Mülhard, 2003). Daneben besteht bei der Enzymwahl die Möglichkeit, zwischen chemisch modifizierter und einer mit Antikörper geblockter Taq-Polymerase zu wählen. Hier müsste ebenfalls die Performance getestet werden.

Optimierungsansätze und Möglichkeiten gibt es noch sehr viele, wie die aufgeführten Beispiele zeigen. Jedoch wurde an dieser Stelle auf eine vertiefende Untersuchung verzichtet und auf einen kommerziell erhältlichen Master-Mix zurückgegriffen (vgl. folgender Abschnitt). Vorrangig sollte das zweite Ziel der Dissertation bearbeitet werden, nämlich die Entwicklung einer DNA-Isolierungsmethode. Die Ausführungen dazu sind in Kapitel 5 dargelegt.

#### 4.4.2 Vergleich verschiedener kommerzieller Master-Mixe

Gegenstand dieser Untersuchung waren zwei kommerziell erhältliche Real-Time PCR Master-Mixe. Dazu wurde auf einen speziell für Multiplex Anwendungen konzipierten Master-Mix (im Folgenden als Mix A bezeichnet) zurückgegriffen sowie ein Mix verwendet (im Folgenden als Mix B bezeichnet), der sich laut Herstellerangaben für Triplex Real-Time PCR Anwendungen eignet.

Untersucht wurden 5 µl DNA von drei verschiedenen Praxisproben, welche unterschiedliche Belastungen mit *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* aufwiesen. Das Primer- und Sonden Setup ist Tabelle 13 zu entnehmen. Mix B wurde ebenfalls in einer Menge von 15 µl (nach Herstellerangaben) dem Reaktionsansatz zugesetzt. Für Mix A wurde das Temperaturprofil 2 aus Abbildung 8 verwendet. Laut Herstellerangaben wurde für Mix B ein Initiationsschritt von 2 Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Polymerase vorgeschaltet. Danach folgten 45 Wiederholungen des Zyklus 15 Sekunden bei 95°C, gefolgt von 1 Minute bei 60°C. Die Detektionskurven sind in der nachfolgenden Abbildung 22 dargestellt.

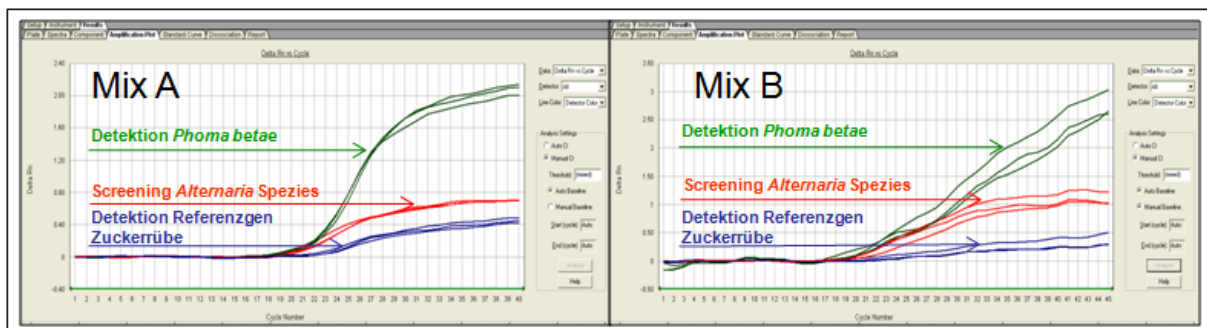


Abbildung 22: Vergleich von Detektionskurven zweier kommerzieller Real-Time PCR Master-Mixe unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut

Analog zur Abbildung 21 sind die Detektionskurven von *Phoma betae* grün, die der *Alternaria* Spezies rot und die des Referenzgens aus der Zuckerrübe blau markiert.

Unter Verwendung von Mix A wurden alle drei Targets der Probe nachgewiesen. Alle Detektionskurven zeigten einen typischen exponentialen Verlauf. Dies konnte bei Mix B nur in Bezug auf die Detektion von *Alternaria* Spezies festgestellt werden. Für den Nachweis von *Phoma betae* sowie des Referenzgens aus der Zuckerrübe verliefen die Kurven nahezu linear. Im Falle der Detektion des Referenzgens war zudem nur eine schwache Fluoreszenzausbeute sichtbar.

Aus diesem Grund wurde Mix A, der Qiagen QuantiTect® Multiplex PCR Kit, für alle Anwendungen gewählt, auch wenn dieser nicht die kostengünstigste Alternative darstellte. Jedoch bestand aufgrund der PCR-Performance und im Hinblick auf die Quantifizierung keine andere Möglichkeit. Dies war vor allem dadurch bedingt, dass bei der Untersuchung von Praxisproben der Keimbesatz häufig variierte. Sowohl besonders geringe als auch besonders hohe Mengen an Ziel-DNA mussten gleichermaßen gut amplifiziert werden.

### 4.4.3 Primer- und Sondenkonzentration

Die Optimierung der Primer- und Sondenkonzentration wird in der Regel anhand einer Primer- und Sondenmatrix vorgenommen. Dazu werden verschiedene Konzentrationen der Oligonukleotide bezüglich Sensitivität, Fluoreszenzausbeute und Verlauf der Detektionskurve geprüft. Allerdings war zu beachten, dass die Reaktionskomponenten des PCR-Ansatzes die genannten Untersuchungsparameter entscheidend beeinflussen, wie dies auch im vorangegangenen Abschnitt deutlich zum Ausdruck kommt. Daher wurde auf eine gesonderte Optimierung der Primer- und Sondenkonzentration verzichtet und stattdessen die im Qiagen Multiplex Handbuch vorgeschlagenen Richtwerte für Triplex PCR-Systeme angewandt (o.V., 2004a). Wie in den Abschnitten 4.2.6 und 4.3.3 dargestellt, waren damit sowohl die Spezifitäts- als auch die Sensitivitätsanforderungen für beide Real-Time Multiplex PCR-Systeme sehr gut erfüllt.

#### 4.4.4 Fluoreszenzmarkierungen

Eingangs wurde bereits beschrieben, dass prinzipiell unterschiedliche Farbstoffe zur Sondenmarkierung genutzt werden können (vgl. Abschnitt 2.2.2.3). Maßgeblich für die Auswahl sind die technischen Parameter der Messplattform, insbesondere die Anregungswellen der Fluorophore und das Emissionsspektrum der Detektionsfilter.

Der Gerätehersteller schlägt für einen Triplex Real-Time PCR Assay zur Messung auf einem ABI PRISM 7000 die in Tabelle 22 aufgeführte Kombination für die Sondenmarkierung vor.

Tabelle 22: Für den verwendeten Thermocycler vom Hersteller empfohlene Sondenmarkierung für Triplex Real-Time PCR Assay

| Sonde Nr. | Farbstoff | Extinktion [nm] | Emission [nm] | Detektionsfilter |
|-----------|-----------|-----------------|---------------|------------------|
| 1         | FAM       | 494             | 518           | 1                |
| 2         | VIC       | 538             | 552           | 2                |
| 3         | NED       | 546             | 575           | 3                |

Für den Anwender besteht allerdings der Nachteil, dass die Sondenmarkierungen 2 und 3 nur von Applied Biosystems bezogen werden können. Den Farbstoff VIC durch HEX (Extinktion 535 nm / Emission 556 nm) zu ersetzen, ist eine gängige Alternative und für Duplex Real-Time PCR Assays bereits beschrieben (Kreuzer *et al.*, 2001). Anders gestaltete sich die Suche nach einer Substitution für den Farbstoff NED. Naheliegender war, die Sonde mit dem Fluorophor TAMRA (Extinktion 565 nm / Emission 580 nm) als Reporter zu markieren, da dieser bereits kalibriert war und wie NED mit Filter 3 des Messgeräts detektiert wird. Daneben stellt der Farbstoff BODIPY-TMR (Extinktion 544 nm / Emission 570 nm) eine zusätzliche Option dar. Dieser musste allerdings auf dem verwendeten Gerät erst kalibriert werden (vgl. Abschnitt 4.2.3).

Die Sonde zur Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe wurde sowohl mit TAMRA (A) als auch mit BODIPY-TMR (B) als Reporter Farbstoff überprüft. Anhand eines Versuchs wurden beide Sonden bezüglich Fluoreszenzausbeute miteinander verglichen. Dazu wurden 12 µl Eppendorf Real Master-Mix, je 200 nM der Primer RefGZR-F und RefGZR-R sowie 200 nM der jeweiligen Sonde pro PCR-Ansatz verwendet. Die PCR erfolgte unter Einsatz des Temperaturprofils 1 in Abbildung 8.

Untersucht wurden drei DNA-Isolate verschiedener Zuckerrübenpflanzen. In der nachfolgenden Abbildung 23 sind die Detektionskurven der beiden Sonden dargestellt.

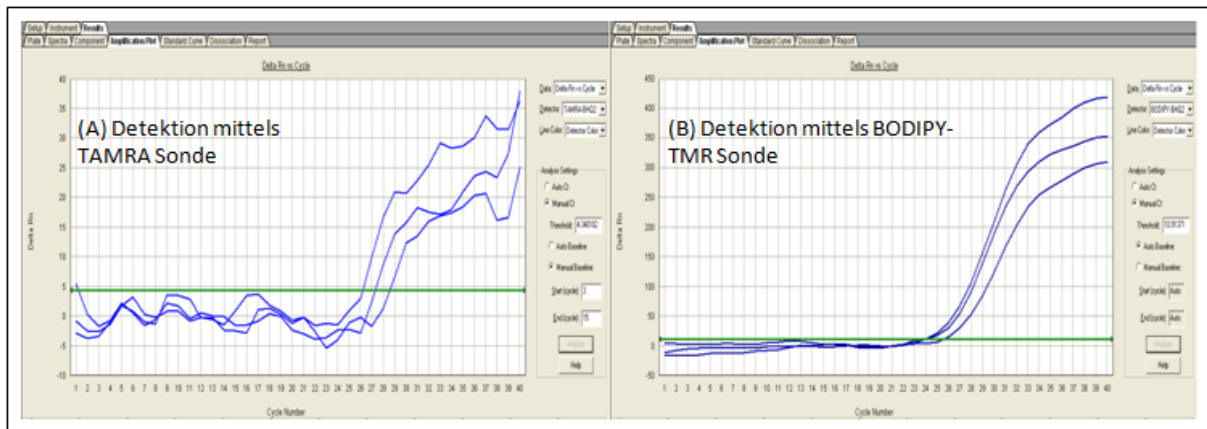


Abbildung 23: Vergleich von Detektionskurven einer TAMRA und einer BODIPY-TMR markierten Sonde bezüglich der Detektion von Zuckerrüben-DNA

Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass sich lediglich die BODIPY-TMR markierte Sonde für die Verwendung im Real-Time Multiplex PCR Assay eignet. Zwar konnte eine Fluoreszenzzunahme auch bei der TAMRA markierten Sonde erkannt werden, diese fiel aber mit einem  $\Delta-R_n$ -Wert von 40 äußerst gering aus.

Der große Unterschied in der Fluoreszenzausbeute resultiert wahrscheinlich aus der niedrigeren Anregungsenergie von BODIPY-TMR, welche bei 542 nm liegt; im Vergleich dazu beträgt sie bei TAMRA etwa 565 nm. Da die Messung mittels ABI PRISM 7000 erfolgte, welcher lediglich bei einer fixen Wellenlänge von 488 nm anregen kann, eignete sich die TAMRA markierte Sonde nicht für die weiteren Untersuchungen.

Des Weiteren wurde durch den Versuch deutlich, warum die höchste Fluoreszenzausbeute immer für die FAM markierte Sonde zu beobachten ist. Der  $\Delta-R_n$ -Wert ist für den Fluoreszenzfarbstoff HEX mit einer Anregungsenergie von 535 nm etwas niedriger und damit nicht so optimal wie bei FAM mit einer Anregungsenergie von 496 nm. Für BODIPY-TMR wird in diesem Zusammenhang der kleinste Wert gemessen (vgl. auch Abbildung 15 bis Abbildung 17) und steht damit in direktem Zusammenhang mit der höchsten Anregungsenergie für diesen Reporterfarbstoff. Folglich sollten sich auf einem Messgerät mit einem breiteren Anregungsspektrum die Unterschiede nicht in diesem Ausmaß beobachten lassen.



## 5 Entwicklung und Optimierung der DNA-Isolierungsmethode

### 5.1 Allgemeiner Aufbau der Versuche

Die DNA-Isolierungsmethode mit nachfolgender Aufreinigung über eine Silika-Membran eignet sich insbesondere für schwierige Probenmatrizes, wie die in dieser Arbeit untersuchten. Dabei werden kommerziell zu erwerbende DNA-Extraktionskits für nahezu alle Problemstellungen offeriert und sind häufig speziell für diese optimiert. Ziel der Entwicklungstätigkeit war es, eine Isolierungsmethode zu finden, die in Bezug auf DNA-Ausbeute und PCR-Performance gleichbleibend gute Ergebnisse lieferte. Als Referenzmethode wurde die DNA-Extraktion nach der Isolierungsvorschrift des NucleoSpin Plant Kits, NucleoSpin Plant: Genomic DNA purification, lysis buffer C1, Macherey-Nagel, 02/2005/Rev.03., Abschnitt 5.1 verwendet.

Alle Puffer- und Materialvariationen des selbst hergestellten Extraktionskits wurden zunächst hinsichtlich der DNA-Ausbeute und PCR-Performance anhand von Getreideproben getestet und bewertet. Dazu wurde die extrahierte DNA der untersuchten Proben mittels Duplex Real-Time PCR Messung überprüft. An dieser Stelle wurden die Primer- und Sondenkombinationen zur Screening Analyse der *Fusarium* Spezies sowie zur Detektion des Referenzgens aus Gerste und Weizen verwendet. Die dritte Detektionsreaktion des Multiplex Assays, der Nachweis der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies, musste nicht separat durchgeführt werden, da diese Gruppe der Schimmelpilze ebenfalls durch die Screening Reaktion erfasst wird. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass für die Duplex Anwendung ein wesentlich kostengünstigerer Master-Mix verwendet werden konnte als für die Triplex-PCR. Bereits mit der Duplex PCR können ineffiziente Methoden früh erkannt und müssen dementsprechend nicht weiter verfolgt werden.

Nach Selektion der besten Methoden für die Isolierung von DNA aus Getreide wurden diese bezüglich ihrer Eignung für die DNA-Extraktion der beiden Pathogene von Zuckerrübensaatgut getestet. In diesem Zusammenhang wurde für die Validierung auf den Real-Time Multiplex PCR Assay zur Identifizierung von *Phoma betae* sowie zum Screening der *Alternaria* Spezies bei gleichzeitiger Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe zurückgegriffen.

Ablauf und Mechanismus der DNA-Isolierung wurden bereits in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Für die Entwicklungstätigkeit wurde der Gesamtprozess in seine einzelnen Komponenten aufgegliedert und diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die DNA-Ausbeute bewertet (vgl. Tabelle 23). Dadurch konnten Schwerpunkte der Entwicklungstätigkeit identifiziert werden, wodurch sich wiederum eine chronologische Vorgehensweise in der Bearbeitung ableiten ließ, wie sie in Tabelle 23 dargestellt ist.

Tabelle 23: Komponenten der DNA-Isolierung, ihre Einflussfaktoren sowie die Auswirkung auf die DNA-Ausbeute

| Komponente                                | Einflussfaktoren auf die DNA-Ausbeute                                 | Auswirkung auf die DNA-Ausbeute |
|---|---|---------------------------------|
| Extraktionspuffer                         | Detergenzien<br>pH-Wert<br>Konzentration der Reagenzien               | hoch                            |
| Bindepuffer                               | pH-Wert<br>Ethanol/Isopropanol Zusatz<br>Konzentration der Reagenzien | hoch                            |
| Silika-Membran                            | DNA-Bindekapazität der Membran  | mittel                          |
| Waschpuffer<br>(Hochsalzkonzentration)    | pH-Wert<br>Konzentration der Reagenzien                               | gering                          |
| Waschpuffer<br>(Niedrigsalzkonzentration) | pH-Wert<br>Konzentration der Reagenzien                               | gering                          |
| Elutionspuffer                            | pH-Wert<br>Konzentration der Reagenzien                               | gering                          |

In zahlreichen Publikationen bzw. Manuals kommerzieller Kits sind verschiedene Rezepte für Extraktionspuffer zur DNA-Isolierung aus Schimmelpilzen und Pflanzen beschrieben (Peterson und Sigler, 1998; van Burik, 1998; o.V., 2002; Yamada *et al.* 2002; Lugert *et al.*, 2006). Diese dienen unter anderem als Grundlage für die Zusammensetzung der einzelnen Extraktionspuffer beziehungsweise Lysepuffer.

In der Kombination des Bindepuffers mit dem Extraktionspuffer ist ein entscheidender Erfolgsfaktor zu sehen. Beide Komponenten müssen bestmöglich aufeinander abgestimmt werden, um neben einer möglichst hohen DNA-Ausbeute auch deren optimale Bindung an die Silika-Membran zu gewährleisten. Zwei Aspekte sind zu beachten: Einerseits, dass die Zellyse in alkalischem Milieu erfolgt und andererseits, dass die Bindung der DNA an die Silika-Membran unter sauren Bedingungen stattfindet (Melzak *et al.*, 1996).

Deshalb spielen pH-Wert und Pufferkapazität in der Mischung aus Lyse- und Bindepuffer eine entscheidende Rolle für den gesamten Prozess der DNA-Isolierung. Daneben ist ebenfalls die Konzentration des chaotropen Salzes für die Bindung der DNA an die Silika-Membran ausschlaggebend.

Wichtiges Kriterium für die Auswahl der Silika-Membran ist, dass diese über eine ausreichende Bindekapazität verfügen muss. Ebenso ist der gesamte Aufbau des sogenannten Spin-Säulchens zu beachten. Verschiedene Hersteller bieten speziell konzipierte Säulchen mit zusätzlichen hydrophoben Schichten oder aber Silika-Membranen unterschiedlicher Schichtdicke an. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene von der PIKA Weihenstephan GmbH zur Verfügung gestellte Spin-Säulchen getestet.

Für die Zusammensetzung der Wasch- sowie der Elutionspuffer existieren wiederum zahlreiche Beschreibungen in verschiedenen Veröffentlichungen. Die Variation der Reaktionskomponenten sowie deren Konzentration im Puffer unterscheiden sich dabei jedoch nur sehr gering. Waschpuffer enthalten meist einen Ethanolanteil, um störende Substanzen aus der Membran zu entfernen, gleichzeitig aber die DNA an der Silika-Membran gebunden zu halten. Als Elutionspuffer kann Wasser oder aber ein Natriumacetatpuffer dienen.

## 5.2 Verwendete Puffer

### 5.2.1 Extraktionspuffer

Für die Versuchsreihen wurden acht verschiedene Extraktionspuffer (abgekürzt EP) hergestellt. Die Zusammensetzung ist den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

Tabelle 24: Zusammensetzung der DNA-Extraktionspuffer EP 1 bis EP 8

| EP 1             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 39,5         | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| EDTA             | 0,5                       | M | 20                   | mM | 2            | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 250                  | mM | 2,5          | ml |
| Triton X-100     | 100                       | % | 1                    | %  | 0,5          | g  |
| Guanidin-HCl     | 5                         | M | 500                  | mM | 5            | ml |
|                  |                           |   | gesamt:              |    | 50           | ml |

| EP 2             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 43           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 150                  | mM | 1,5          | ml |
| SDS              | 10                        | % | 1                    | %  | 5            | ml |
|                  |                           |   | gesamt:              |    | 50           | ml |

| EP 3             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 42,4         | ml |
| EDTA             | 0,5                       | M | 1                    | mM | 0,1          | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 100                  | mM | 1            | ml |
| Triton X-100     | 100                       | % | 2                    | %  | 1            | g  |
| SDS              | 10                        | % | 1                    | %  | 5            | ml |
|                  |                           |   | gesamt:              |    | 50           | ml |

## Entwicklung und Optimierung der DNA-Isolierungsmethode

---

| EP 4             | Konzentration Stammlösung |     | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|-----|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |     |                      |    | 28           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M   | 100                  | mM | 5            | ml |
| NaCl             | 5                         | M   | 1,4                  | M  | 14           | ml |
| EDTA             | 0,5                       | M   | 20                   | mM | 2            | ml |
| CTAB             | 20                        | g/l | 1                    | l  | 1            | g  |
| gesamt:          |                           |     |                      |    | 50           | ml |

| EP 5             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 46           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 50                   | mM | 2,5          | ml |
| Sarcosyl         | 100                       | % | 1                    | %  | 0,5          | g  |
| EDTA             | 0,5                       | M | 10                   | mM | 1            | ml |
| gesamt:          |                           |   |                      |    | 50           | ml |

| EP 6             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 39           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 40                   | mM | 2            | ml |
| EDTA             | 0,5                       | M | 20                   | mM | 2            | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 150                  | mM | 1,5          | ml |
| SDS              | 10                        | % | 1                    | %  | 5            | ml |
| Sarcosyl         | 100                       | % | 1                    | %  | 0,5          | ml |
| gesamt:          |                           |   |                      |    | 50           | ml |

| EP 7             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 38           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 150                  | mM | 1,5          | ml |
| SDS              | 10                        | % | 2                    | %  | 10           | ml |
| gesamt:          |                           |   |                      |    | 50           | ml |

| EP 8             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 38,4         | ml |
| EDTA             | 0,5                       | M | 1                    | mM | 0,1          | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 100                  | mM | 1            | ml |
| Tween 20         | 100                       | % | 10                   | %  | 5            | g  |
| SDS              | 10                        | % | 1                    | %  | 5            | ml |
| gesamt:          |                           |   |                      |    | 50           | ml |

### 5.2.2 Bindepuffer

Zwei unterschiedliche Bindepuffer (abgekürzt BP) wurden in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der DNA-Bindepuffer BP 1 und BP 2

| BP 1                 | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|----------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O     |                           |   |                      |    | 7            | ml |
| MOPS                 | 0,5                       | M | 50                   | mM | 5            | ml |
| Phenolrot            |                           |   |                      |    | 0,5          | ml |
| Guanidinhydrochlorid | 8                         | M | 6                    | M  | 37,5         | ml |
| gesamt:              |                           |   |                      |    | 50           | ml |

| BP 2                 | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|----------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O     |                           |   |                      |    | 1            | ml |
| Harnstoff            | 1                         | M | 10                   | mM | 0,5          | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0     | 1                         | M | 20                   | mM | 1,00         | ml |
| Triton X-100         | 100                       | % | 20                   | %  | 10           | g  |
| Guanidinhydrochlorid | 8                         | M | 6                    | M  | 37,5         | ml |
| gesamt:              |                           |   |                      |    | 50           | ml |

### 5.2.3 Waschpuffer

Für die Waschschrirte wurden die folgenden zwei Puffer verwendet.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Waschpuffer WP 1 und WP 2 zur Aufreinigung der im Spin-Säulchen gebundenen DNA

| WP 1                 | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|----------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O     |                           |   |                      |    | 58,58        | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0     | 1                         | M | 20                   | mM | 3,30         | ml |
| Guanidinhydrochlorid | 8                         | M | 5                    | M  | 103,125      | ml |
|                      |                           |   | gesamt:              |    | 165          | ml |

Vor Gebrauch wurden dem Waschpuffer 1 (WP 1) noch 100 ml Ethanol absolut zugesetzt.

| WP 2             | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 99,40        | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 2                    | mM | 0,20         | ml |
| NaCl             | 5                         | M | 20                   | mM | 0,40         | ml |
|                  |                           |   | gesamt:              |    | 100,00       | ml |

Vor Gebrauch wurden dem Waschpuffer 2 (WP 2) noch 400 ml Ethanol absolut zugesetzt.

### 5.2.4 Elutionspuffer

Zur Elution wurde ein 5 mM Tris-HCl Puffer, pH-Wert 8,0 verwendet.

Tabelle 27: Zusammensetzung des DNA-Elutionspuffers ELT 1

| ELT 1            | Konzentration Stammlösung |   | Konzentration im Mix |    | Menge im Mix |    |
|------------------|---------------------------|---|----------------------|----|--------------|----|
| H <sub>2</sub> O |                           |   |                      |    | 99           | ml |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 1                         | M | 10                   | mM | 1            | ml |
|                  |                           |   | gesamt:              |    | 100          | ml |

## 5.3 Versuchsablauf

### 5.3.1 Probenverarbeitung

Da sich die Entwicklungstätigkeit vorrangig auf die Optimierung der einzelnen Puffer und deren Zusammensetzung bezieht, wurden für alle Versuche die gleichen zerkleinerten Praxisproben von Gerstenmalz bzw. Zuckerrübensaatgut verwendet. Nach der Zerkleinerung des Probenmaterials wurde dieses bei  $-21^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für alle Extraktionen wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, 100 mg des jeweiligen Probenmaterials verwendet. Ebenso wurden alle Proben zusätzlich mechanisch mit Glass Beads behandelt, da diesem Schritt ein positiver Effekt auf die DNA-Ausbeute aus Schimmelpilzen zugeschrieben wird (van Burik, 1998).

Inkubations- und Zentrifugationszeiten sowie Zentrifugationsgeschwindigkeiten und pipettierte Volumina wurden in allen Versuchen konstant gehalten. Mit Ausnahme von Versuch 4 wurde immer dasselbe Spin-Säulchen Typ 2 verwendet.

Das allgemeine Ablaufschema gestaltet sich demnach wie folgt:

1. 0,1 g zerkleinertes Saatgut in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß einwiegen
2. Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Extraktionspuffers und einer Spatelspitze Glass Beads (ca. 75 mg)
3. Probe sofort 10 sek vortexen
4. 5 min auf dem Vortexer bei voller Drehzahl mischen
5. 30 min Inkubation bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock
6. 5 min bei 10.000 x g abzentrifugieren
7. 300  $\mu\text{l}$  Überstand in steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß transferieren
8. 300  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Bindepuffers und 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol zusetzen
9. Mischung der Komponenten durch kurzes Vortexen des Eppendorfgefäßes
10. Spin-Säulchen in 2,0 ml Zentrifugenröhrchen einsetzen und Flüssigkeit auf die Säule geben
11. 1 min bei 8.000 x g abzentrifugieren, Eluat verwerfen, Säulchen wieder in 2 ml Eppendorfgefäß einsetzen
12. 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer 1 zusetzen
13. 1 min bei 8.000 x g abzentrifugieren, Eluat verwerfen, Säulchen wieder in 2 ml Eppendorfgefäß einsetzen
14. 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer 2 zusetzen



15. 1 min bei 8.000 x g abzentrifugieren, Eluat verwerfen, Säulchen wieder in 2 ml Eppendorfgefäß einsetzen
16. 500 µl Waschpuffer 2 zusetzen
17. 1 min bei 8.000 x g abzentrifugieren, Eluat verwerfen, Säulchen wieder in 2 ml Eppendorfgefäß einsetzen
18. 2 min bei 20.000 x g abzentrifugieren, Eluat verwerfen, darauf achten, dass sich keine Flüssigkeit mehr im Zentrifugenröhrchen befindet
19. Spin-Säulchen in ein neues, steriles 1,5ml Eppendorfgefäß einsetzen
20. 100 µl des auf 70°C vorgeheizten Elutionspuffers zusetzen
21. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
22. 1 min bei 11.000 x g abzentrifugieren, die eluierte DNA kann sofort verwendet werden bzw. ist bei -21°C zu lagern

### 5.3.2 Analyse von DNA-Isolaten

#### 5.3.2.1 Getreideproben

Wie eingangs beschrieben, wird zur Bestimmung der *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen ein Duplex PCR Assay verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsmixes ist in Tabelle 28 wiedergegeben. Die Messungen wurden unter Verwendung des Temperaturprofils 1 in Abbildung 8 mit 5 µl der jeweils extrahierten DNA durchgeführt.

Tabelle 28: Zusammensetzung Reaktionsansatz Real-Time Duplex PCR zum Screening von *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen

| Bezeichnung                   | Konzentration Stammlösung | Konzentration im Mix | µl / Mix | Hersteller / Bezeichnung |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------|----------|--------------------------|
| H2O                           |                           |                      | 9,40     | Ampuwa                   |
| Master Mix                    | 2,5 x                     | 1 x                  | 12,00    | Eppendorf RealMasterMix  |
| Probe Enhancer                |                           |                      | 1,50     | Eppendorf                |
| Vorwärtsprimer 1 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45     | Fus_fp_V2                |
| Rückwärtsprimer 1 (3'-Primer) | 20 µM                     | 300 nM               | 0,45     | Fus_scr_rp_V1            |
| Sonde 1                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30     | Fus_scr_probe_V1         |
| Vorwärtsprimer 2 (5'-Primer)  | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30     | RefGBM_fp_V1             |
| Rückwärtsprimer 2 (3'-Primer) | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30     | RefGBM_rp_V2             |
| Sonde 2                       | 20 µM                     | 200 nM               | 0,30     | RefGBM_probe_V3          |

### 5.3.2.2 Zuckerrübensaatgutproben

Die DNA-Extrakte der Zuckerrübensaatgutproben wurden mittels dem in Tabelle 13 aufgeführten Real-Time Multiplex PCR Reaktionsansatz und dem in Abbildung 8 dargestellten Temperaturprofil 2 gemessen. Auch in diesem Fall wurden 5 µl DNA in die PCR eingesetzt.

### 5.3.3 Bewertung der DNA-Extraktion

Maßgebliche Bewertungsgrundlage war die Ausbeute an DNA nach der Extraktion. Das heißt, je kleiner der Ct-Wert, desto größer war die Menge an isolierter DNA der ursprünglichen Probe. Daneben flossen die Höhe der Fluoreszenzausbeute sowie der Verlauf der Detektionskurve als zusätzliche Kriterien für die PCR-Performance mit in die Auswertung ein. Diese waren von besonderem Interesse, wenn verschiedene Puffer in Bezug auf den Ct-Wert annähernd gleiche Ergebnisse lieferten.

In den nachfolgenden graphischen Darstellungen werden jeweils die Ct-Werte in Bezug auf den Fluoreszenzfarbstoff wiedergegeben. Des Weiteren sind für die ersten drei Versuchsreihen die Fluoreszenzausbeuten in Form von  $\Delta$ -R<sub>n</sub>-Werte als zusätz-

liches Entscheidungskriterium dargestellt.<sup>1</sup> Für die anschließenden Versuche wurde die Standardabweichung als Bewertungshilfe für die DNA-Isolierung verwendet.

Angegeben werden jeweils die Detektionssysteme sowie die zugehörigen Farbstoffe der Detektionssonden. Für die Messung der DNA-Extraktion von *Fusarium* Spezies aus Getreideproben wird die Belastung durch Pathogene im FAM-Kanal gemessen. Alle Messwerte im FAM-Kanal werden in den Abbildungen stets grün markiert. Der Farbstoff HEX bezieht sich auf den Nachweis des Referenzgens aus Gerste und Weizen und wird in den graphischen Darstellungen rot gefärbt. Im Falle der Betrachtung der DNA-Extraktion aus Zuckerrübensaatgut entspricht FAM der Identifizierung von *Phoma betae*. Der Farbstoff HEX zeigt die Screening Reaktion der *Alternaria* Spezies. Mit BODIPY-TMR wird das Referenzgen aus der Zuckerrübe detektiert, dieser Farbstoff wird in den Abbildungen blau dargestellt.

## 5.4 Versuchsdurchführung

### 5.4.1 Vergleich verschiedener Extraktionspuffer

Ziel des Versuchs war der Vergleich verschiedener Extraktionspuffer. Dazu wurde DNA aus jeweils der gleichen Gerstenmalzprobe nach dem Ablaufschema aus Abschnitt 5.3 isoliert. In parallelen Ansätzen E1 bis E8 wurde je einer der acht eigens dafür hergestellten Extraktionspuffer verwendet. Als Bindepuffer wurde in allen Ansätzen BP 1 verwendet. In einem weiteren Ansatz wurde der Lysepuffer C1 des Macherey-Nagel Kits unter ansonst gleichen Bedingungen eingesetzt. Als Kontrolle wurde eine DNA-Isolierung nach der Referenzmethode (abgekürzt RM) von Macherey-Nagel durchgeführt.

Pro Probe wurden vier Messwerte generiert: Der jeweilige Ct-Wert der Detektion von *Fusarium*-DNA sowie von Getreide-DNA mit den zugehörigen Fluoreszenzausbeuten. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Probenmessung wiedergegeben, wobei die gemessenen Ct-Werte als Balken und die Fluoreszenzausbeuten durch Rauten dargestellt sind. Zur einfacheren Orientierung sind die Messresultate der Detektion der *Fusarium*-DNA in grünen Balken und die der Getreide-DNA in roten Balken dargestellt. Die Farbauswahl erfolgte analog zum Reporterfarbstoff.

---

<sup>1</sup> Die Beobachtungen aus Abschnitt 4.4.1 bezüglich der Fluoreszenzausbeute des Farbstoffs FAM gelten auch hier, so sind die Messwerte durch den Faktor 10 dividiert in den Graphiken dargestellt.

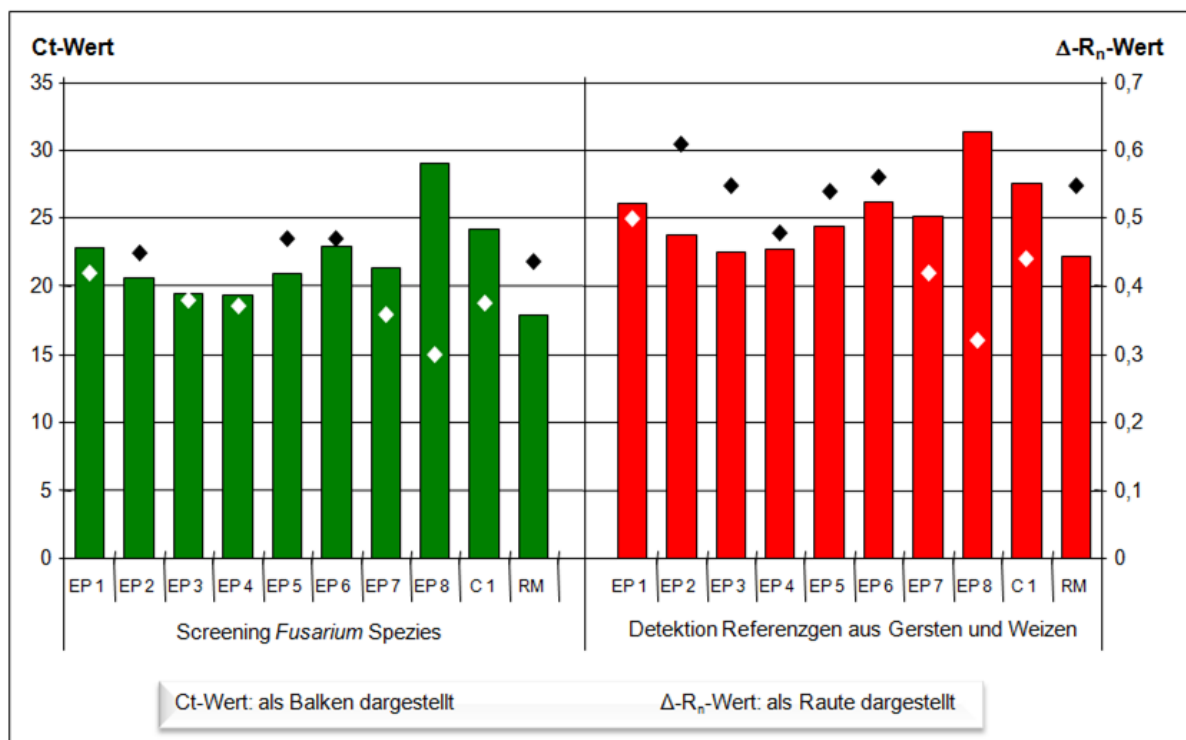


Abbildung 24: Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute unter Verwendung von Bindepuffer BP 1; Messung mittels Duplex Real-Time PCR Assay

Anhand der in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse konnten verschiedene Schlüsse gezogen werden. Zunächst liefert die Referenzmethode (RM) die niedrigsten Ct-Werte in den beiden Kategorien und damit die höchsten Werte sowohl für die Ausbeute an *Fusarium*-DNA als auch für die Menge an Pflanzen-DNA.

Von den selbst hergestellten Extraktionspuffern erzielten EP 3 und EP 4 die besten Ergebnisse hinsichtlich des Ct-Werts und damit bezüglich der DNA-Ausbeute in den zwei betrachteten Kategorien. Beide Puffer enthalten eine Kombination aus chaotropen Substanzen sowie nichtionischen Detergenzien.

Im Hinblick auf die Fluoreszenzausbeute werden die insgesamt besten Resultate unter Einsatz der Extraktionspuffer EP 2, EP 5 und EP 6 gemessen. Allerdings lässt sich keine Korrelation zwischen den  $\Delta$ -R<sub>n</sub>-Werten von FAM und HEX feststellen. Die Puffer mit der höchsten Fluoreszenzausbeute für FAM (EP 5 und EP 6) bedingen nicht gleichzeitig auch den höchsten Wert für HEX (EP 2).

Die schlechtesten Messwerte bezüglich aller untersuchten Parameter liefert EP 8, dieser Puffer wurde daraufhin nicht weiter verwendet. Auch schieden EP 1 und EP 7 für die weiteren Untersuchungen aus, da beide neben den relativ hohen Ct-Werten auch schlechte Fluoreszenzausbeuten lieferten.

Eine weitere wichtige Erkenntnis konnte aus dem Vergleich der gemessenen Ct-Werte der Ansätze C1 und RM gezogen werden. In beiden Fällen wurde der gleiche Extraktionspuffer, jedoch unterschiedliche Wasch-, Binde- und Elutionspuffer verwendet. Dies deutete darauf hin, dass die Kombination zwischen Extraktionspuffer und den anderen Pufferkomponenten einen entscheidenden Einfluss auf die DNA-Ausbeute haben muss.

### 5.4.2 Vergleich verschiedener Bindepuffer

In diesem Versuch sollten die besten Extraktionspuffer aus Versuch 1 in Verbindung mit Bindepuffer BP 2 getestet werden. Als Kontrolle wurde wieder eine DNA-Isolierung nach der Referenzmethode von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Untersuchung sollte zeigen, ob unter Verwendung eines anderen Bindepuffers die DNA-Ausbeute gesteigert werden kann. Auch diese Messdaten sind nach dem gleichen Schema wie in Versuch 1 graphisch in Abbildung 25 aufbereitet; die gemessenen Ct-Werte sind als Balken, die Fluoreszenzausbeuten durch Rauten dargestellt.

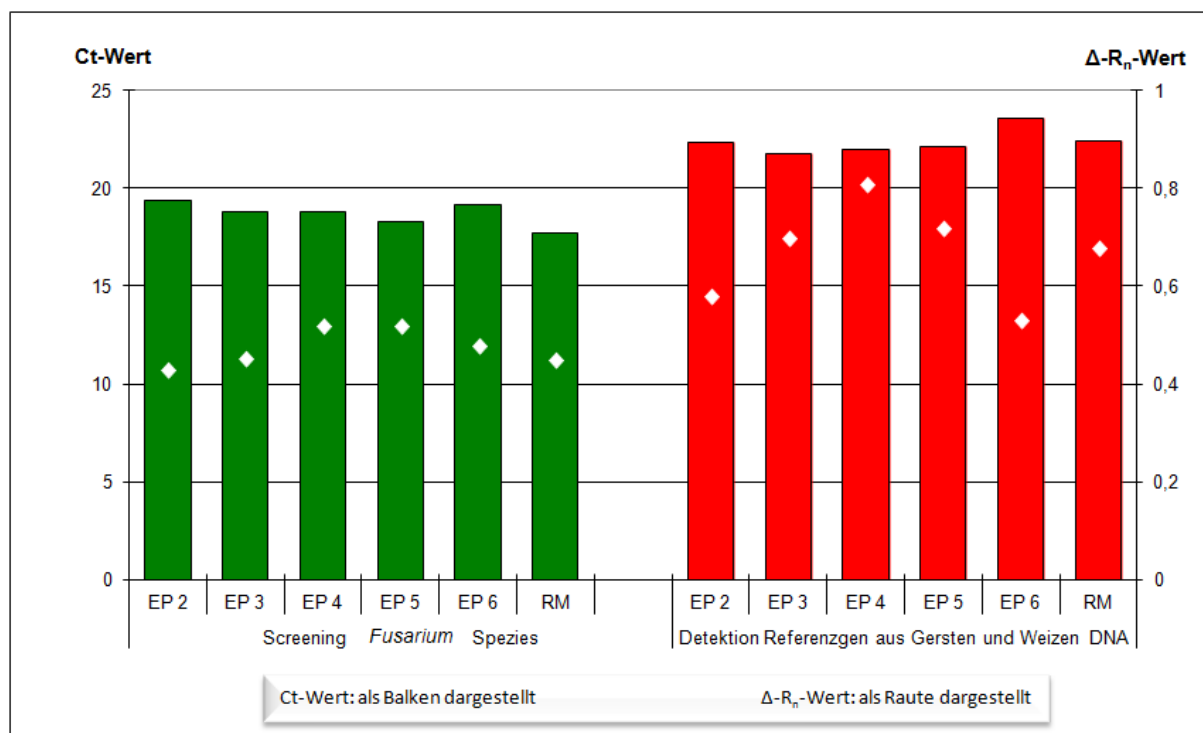


Abbildung 25: Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute bei Verwendung von Bindepuffer BP 2, Messung mittels Duplex Real-Time PCR Assay

Beim Vergleich der gemessenen Ct-Werte der mit selbst hergestellten Extraktionspuffern isolierten DNA mit der aus der Referenzmethode in Abbildung 25 war auffällig, dass diese im Fall von EP 3, EP 4 und EP 5 insgesamt keine so großen Unterschiede mehr aufwiesen wie dies noch in Versuch 1 der Fall war. Für die Detektion der *Fusarium*-DNA wurde mit der Referenzmethode der niedrigste Ct-Wert erzielt, gefolgt von der Anwendung des Extraktionspuffers 5. Die Getreide-DNA wurde mit EP 3, EP 4 und EP 5 gleichwertig zur Referenzmethode am besten extrahiert. Insgesamt wurden unter Verwendung der selbst hergestellten Extraktionspuffer in diesem Versuch durchweg niedrigere Ct-Werte als in Versuch 1 gemessen. Die höchste Fluoreszenzausbeute wurde unter Verwendung der Puffer EP 4 und EP 5 festgestellt.

Die beiden Extraktionspuffer EP 2 und EP 6 lieferten sowohl in Bezug auf die ermittelten Ct-Werte als auch auf die Fluoreszenzausbeute marginal schlechtere Resultate. Um eine abschließende Bewertung der DNA-Isolierungsmethode vorzunehmen, wurde der gleiche Versuch analog für die DNA-Extraktion der beiden Pathogene des Zuckerrübensaatguts durchgeführt.

Insgesamt ließ sich aus der zweiten Versuchsserie schlussfolgern, dass der verwendete Puffer BP 2 deutlich bessere Bindeeigenschaften in Kombination mit den eingesetzten Extraktionspuffern besitzt und dadurch auch höhere DNA-Ausbeuten als BP 1 liefert. Aus diesem Grund wurde BP 2 in allen nachfolgenden Versuchsreihen verwendet.

### 5.4.3 DNA-Isolierung mit optimierten Extraktions- und Bindepuffern

Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, wie sich die Extraktions- und Bindepufferkombination aus Versuch 2 auf die DNA-Isolierung von *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* aus Zuckerrübensaatgut auswirkt. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine DNA-Isolierung unter Verwendung der Referenzmethode durchgeführt. An dieser Stelle wurden pro Probe sechs Messdaten ermittelt, die Ct-Werte für die beiden Pathogene und die Zuckerrüben-DNA sowie die drei zugehörigen Fluoreszenzausbeuten. Diese sind graphisch in Abbildung 26 aufbereitet, wobei die einzelnen Resultate nach der jeweiligen Detektionsreaktion gegliedert sind.

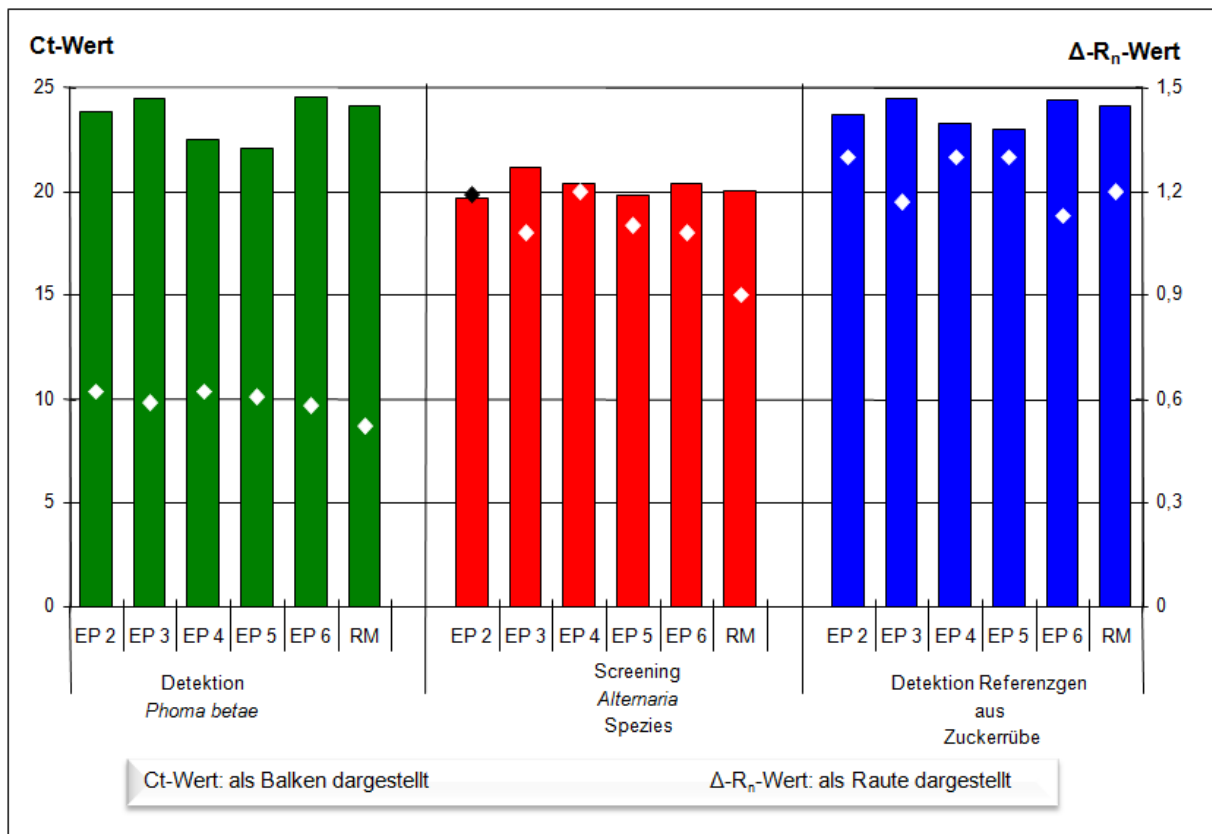


Abbildung 26: Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute unter Verwendung von Bindepuffer BP 2; Messung mittels Triplex Real-Time PCR Assay

In Abbildung 26 wurde ersichtlich, dass die Extraktionspuffer EP 4 und EP 5 insgesamt sehr gute Ergebnisse in Bezug auf die Ct-Werte und damit auf die Ausbeute der DNA von *Phoma betae*, *Alternaria* Spezies und Zuckerrübensaatgut lieferten. Für die Ct-Werte von *Phoma betae* und dem Referenzgen wurden mit diesen zwei Puffern im Vergleich zur Referenzmethode durchweg niedrigere Werte generiert. Ebenso lagen alle gemessenen Fluoreszenzausbeuten bei Verwendung der Puffer EP 4 und EP 5 über denen der Referenzmethode.

Keine eindeutige Tendenz ließ sich unter Verwendung von EP 2 feststellen. Zwar wurde für die Extraktion der *Alternaria* Spezies DNA der niedrigste Ct-Wert erzielt, für die beiden anderen Untersuchungskriterien, der Nachweis von *Phoma betae* DNA sowie DNA aus der Zuckerrübe, etwas schlechtere als beim Einsatz von Puffer EP 4 und EP 5. Die beiden Puffer EP 3 und EP 6 zeigten im Gegensatz dazu in allen Kategorien hohe Ct-Werte verbunden mit einer niedrigen Fluoreszenzausbeute.

Abschließend galt es zu bestimmen, welcher Puffer sich sowohl für die Extraktion der *Fusarium* Spezies DNA von Getreide als auch für die der Pathogenen des Zuckerrübensaatguts am besten eignet. Um die gesamte Auswertung einfacher zu gestalten, wurden alle gemessenen Daten aus den beiden Versuchen 2 und 3 in prozentualen Bezug zueinander gesetzt. Dabei stellte der niedrigste gemessene Ct-Wert einer Versuchsreihe, sprich die höchste DNA-Ausbeute das Optimum dar. Ebenso wurde die höchste gemessene Fluoreszenzausbeute einer Versuchsreihe als optimaler Wert festgelegt.

Von allen anderen ermittelten Werten wurde die prozentuale Abweichung vom Optimum berechnet. Im Anschluss wurden alle prozentualen Abweichungen spaltenweise summiert. Je kleiner die resultierende Summe, desto besser eignet sich der Puffer zur DNA-Extraktion. Die nachfolgenden Tabelle 29 und Tabelle 30 zeigen die Ergebnisse in Bezug auf den Ct-Wert und die Fluoreszenzausbeute.



Tabelle 29: Prozentuale Abweichung der Ct-Werte bezogen auf die Verwendung von 5 unterschiedlichen Extraktionspuffern im Vergleich zur Referenzmethode

| Detektionssystem                    | Abweichung der Ct-Werte [%] |              |              |             |              | Referenzmethode |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-----------------|
|                                     | EP 2                        | EP 3         | EP 4         | EP 5        | EP 6         |                 |
| Screening <i>Fusarium</i> Spezies   | 8,57                        | 5,64         | 5,59         | 3,01        | 7,47         | 0,00            |
| Referenzgen Gerste   Weizen         | 2,51                        | 0,00         | 0,91         | 1,45        | 7,67         | 2,98            |
| Identifizierung <i>Phoma betae</i>  | 7,26                        | 9,69         | 1,78         | 0,00        | 10,05        | 8,11            |
| Screening <i>Alternaria</i> Spezies | 0,00                        | 7,40         | 3,63         | 0,81        | 3,58         | 2,00            |
| Referenzgen Zuckerrübe              | 3,08                        | 5,93         | 0,95         | 0,00        | 5,70         | 4,37            |
| <b>Summe</b>                        | <b>21,41</b>                | <b>28,66</b> | <b>12,86</b> | <b>5,27</b> | <b>34,48</b> | <b>17,45</b>    |

Tabelle 30: Prozentuale Abweichung der Fluoreszenzausbeute bezogen auf die Verwendung von 5 unterschiedlichen Extraktionspuffern im Vergleich zur Referenzmethode

| Detektionssystem                    | Abweichung $\Delta$ -R <sub>n</sub> -Werte [%] |              |             |              |              | Referenzmethode |
|-------------------------------------|--|--------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|
|                                     | EP 2   | EP 3         | EP 4        | EP 5         | EP 6         |                 |
| Screening <i>Fusarium</i> Spezies   | 17,31  | 13,08        | 0,00        | 0,00         | 7,69         | 13,46           |
| Referenzgen Gerste   Weizen         | 28,40  | 13,58        | 0,00        | 11,11        | 34,57        | 16,05           |
| Identifizierung <i>Phoma betae</i>  | 0,00   | 4,84         | 0,00        | 1,61         | 6,45         | 16,13           |
| Screening <i>Alternaria</i> Spezies | 0,83   | 10,00        | 0,00        | 8,33         | 10,00        | 25,00           |
| Referenzgen Zuckerrübe              | 0,00   | 10,00        | 0,00        | 0,00         | 13,08        | 7,69            |
| <b>Summe</b>                        | <b>45,70</b>                                   | <b>26,66</b> | <b>0,00</b> | <b>11,11</b> | <b>42,26</b> | <b>29,51</b>    |

Für eine grobe Vorauswahl zur Bestimmung des besten selbst hergestellten Extraktionspuffers bietet es sich an, die in der Summe niedrigsten prozentualen Abweichungen einer genaueren Betrachtung zu unterziehen. Wie aus Tabelle 29 und Tabelle 30 hervorgeht, stellen demnach die beiden Extraktionspuffer EP 4 und EP 5 in Verbindung mit Bindepuffer BP 2 eine adäquate Alternative zur Referenzmethode dar.

Unter Verwendung von EP 5 ergeben sich insgesamt die niedrigsten Ct-Werte. Die größte prozentuale Abweichung vom optimalen Wert, der unter Verwendung der Referenzmethode ermittelt wurde, beträgt 3,01 % und wurde für die Extraktion der *Fusarium* Spezies DNA ermittelt. Daneben wurden mit EP 4 in der Summe mit einer Abweichung von 12,86 % die zweitbesten Resultate bezüglich der gemessenen Ct-Werte erzielt. Damit bewegte sich dieser Wert noch unter dem der Referenzmethode mit 17,45 %. Allerdings war zu beachten, dass im Vergleich zwischen EP 4 und EP 5 nur hinsichtlich der DNA-Ausbeute aus Getreide ein besseres Resultat erzielt wurde.

In Bezug auf die Fluoreszenzausbeute kehrten sich die Resultate zwischen EP 4 und EP 5 um. Diesbezüglich ist EP 4 eindeutig die beste Wahl, da grundsätzlich der optimale Wert unter Verwendung dieses Puffers gemessen wurde. Mit einer Abweichung von 11,11 % in der Summe lag der Puffer EP 5 für dieses Untersuchungskriterium ebenfalls unter dem der Referenzmethode mit 29,51 %.

Extraktionspuffer EP 6 schnitt in der Gesamtwertung am schlechtesten ab. Die Ct-Werte wiesen die höchste Abweichung vom Optimum auf. Ebenso lag die prozentuale Abweichung für die Fluoreszenzausbeute bei 42,26 % und damit nur knapp 3,5 % unter dem schlechtesten Resultat, welches mit EP 2 gemessen wurde. Dieses ist im Falle von EP 2 allerdings maßgeblich durch die hohen Abweichungen aus Versuch 2 bedingt. Der gemittelte Ct-Wert dieses Puffers bewegte sich nur ca. 4,0 % über dem der Referenzmethode. Für die *Alternaria* Spezies Extraktion in Versuch 3 wurde hier sogar der optimale Wert gemessen. Für weitere Versuche wurden die beiden Puffer indessen nicht mehr herangezogen, weil sie in Bezug auf die DNA-Ausbeute der *Fusarium* DNA die schlechtesten Resultate lieferten.

Mit Hilfe von Extraktionspuffer 3 konnte in Versuch 2 die größte Ausbeute an Gersten-DNA gemessen werden. Im Gegensatz dazu weisen alle anderen DNA-Mengen deutliche negative Abweichungen vom optimalen Wert auf. In der Summe ergibt sich die zweitschlechteste DNA-Ausbeute. Auch wenn in Bezug auf die Fluoreszenzausbeute das drittbeste Ergebnis erzielt wurde, eignete sich auch dieser Puffer nicht für die Verwendung in den weiteren Versuchsreihen.

#### 5.4.4 Vergleich unterschiedlicher Spin-Säulchen

Nachdem die beiden besten Extraktionspuffer EP 4 und EP 5 in Kombination mit Bindepuffer BP 2 gefunden waren, sollte in diesem Versuch der Einfluss des Spin-Säulchens auf die DNA-Ausbeute geprüft werden. Dazu wurde das in den vorangegangenen Versuchen verwendete Säulchen Typ 2 sowie ein Säulchen Typ 1 mit höherer Bindekapazität verwendet.

Pro Spin-Säulchen und Extraktionspuffer wurde jeweils aus drei parallelen Ansätzen DNA aus der Gerstenmalz- und der Zuckerrübensaatzprobe isoliert und diese im Anschluss mittels Real-Time PCR analysiert. Da bezüglich der Fluoreszenzausbeuten nur marginale Abweichungen festzustellen waren, sind diese nicht aufgeführt. Alle gemessenen Ct-Werte wurden jeweils gemittelt und sind mit der zugehörigen Standardabweichung in Abbildung 27 dargestellt. Die Ordinaten in beiden Diagrammen sind gekürzt, um den Bereich von Ct-Wert 18 bis 26 detaillierter abzubilden.

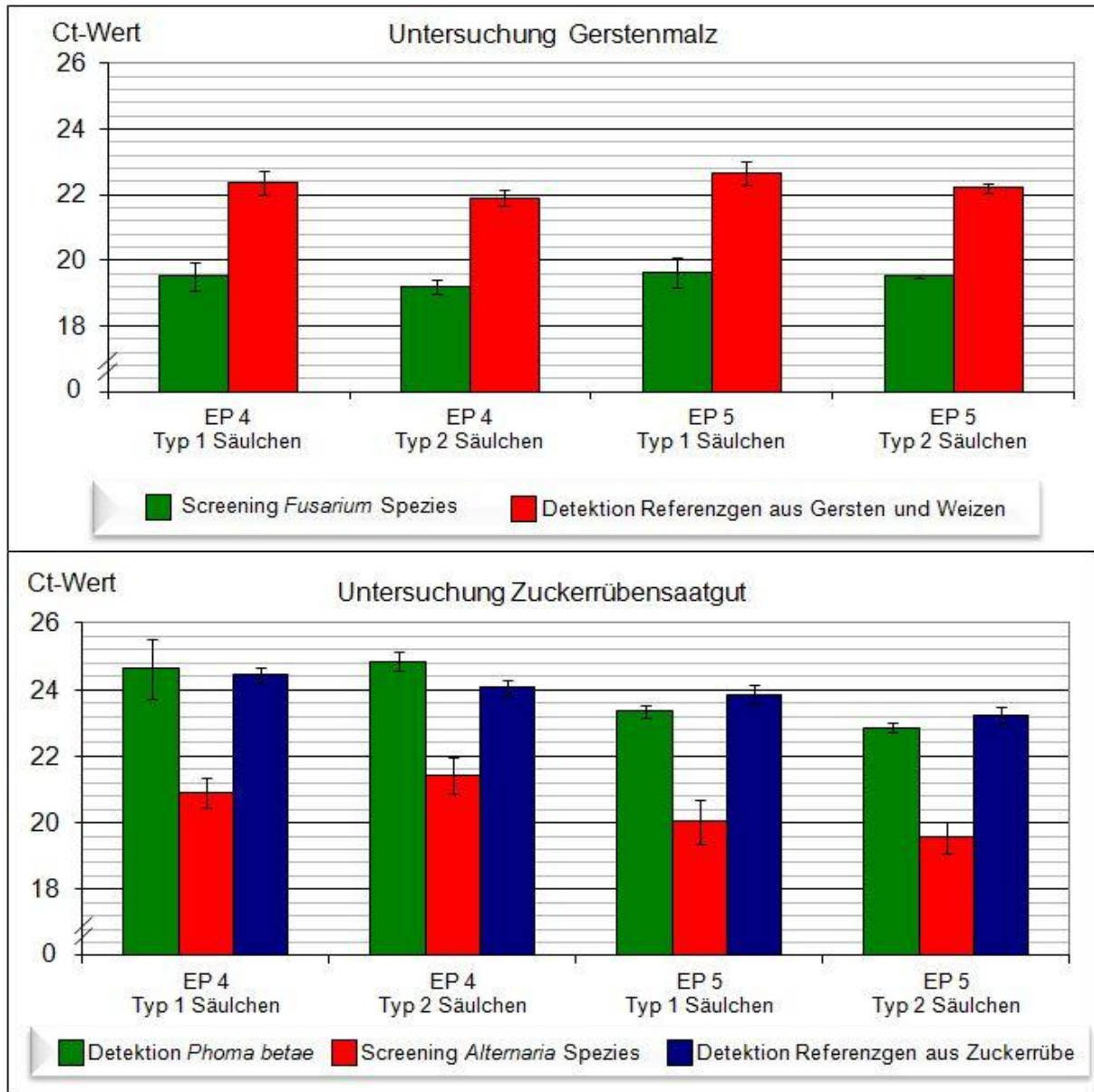


Abbildung 27: Ct-Werte und Standardabweichungen der Messwerte bei Verwendung von Extraktionspuffer EP 4 und EP 5 mit verschiedenen Spin-Säulchen und Probenmatrizes

Bei Betrachtung der oberen Hälfte der Abbildung 27 wird deutlich, dass im Falle der DNA-Isolierung aus Gerstenmalz die Verwendung des Säulchens vom Typ 2 unabhängig vom Extraktionspuffer die niedrigsten Ct-Werte und Standardabweichungen lieferte. Insgesamt wurden unter Verwendung von Säulchen Typ 2 in Verbindung mit EP 4 die niedrigsten Ct-Werte in Bezug auf die Extraktion sowohl aus *Fusarium* Spezies DNA als auch aus Gersten-DNA gemessen. Mit Puffer EP 5 wurden dagegen die geringsten Standardabweichungen ermittelt, d.h. die Methode war am reproduzierbarsten.

In Bezug auf Zuckerrübensaatgut (unterer Teil der Abbildung 27) ließen sich die niedrigsten Ct-Werte unter Verwendung des Puffers EP 5 beobachten, wobei die besten Resultate für die Standardabweichung wieder beim Einsatz des Säulchens Typ 2 festzustellen waren. Für EP 4 war keine eindeutige Tendenz zwischen Säulchen-Typ und ermitteltem Ct-Wert und Standardabweichung zu beobachten. Hier wurden im Fall der beiden Pathogene, repräsentiert durch Ct-Werte der Farbstoffe FAM und HEX, unter Verwendung des Säulchens Typ 1 marginal niedrigere Ct-Werte gemessen. Allerdings war die Standardabweichung von FAM diesbezüglich sehr hoch. Anders verhielt es sich bei Betrachtung der DNA aus der Zuckerrübe, hier lagen die Ct-Werte bei Säulchen Typ 2 etwas niedriger.

Um die Gesamtauswertung einfacher zu gestalten, bot es sich auch in diesem Fall an, die Ct-Werte nach dem in Versuch 3 beschriebenen Schema mit der prozentualen Abweichung vom Optimum, das heißt dem niedrigsten gemessenen Ct-Wert in Verbindung zu setzen. Die zugehörigen Daten sind in Tabelle 31 gelistet. Als weiteres Kriterium zur Bewertung der Versuche sind in Tabelle 32 die Standardabweichungen der einzelnen Versuche summiert.

Tabelle 31: Prozentuale Abweichung der Ct-Werte unter Verwendung von Extraktionspuffer 4 und 5 und Säulchen Typ 1 und 2 bezogen auf den optimalen Wert einer Messreihe

| Detektionssystem                             | Abweichung der Ct-Werte [%] |                        |                        |                        |
|--|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|  | EP 4<br>Säulchen Typ 1      | EP 4<br>Säulchen Typ 2 | EP 5<br>Säulchen Typ 1 | EP 5<br>Säulchen Typ 2 |
| Screening <i>Fusarium</i><br>Spezies         | 1,52                        | 0,00                   | 2,14                   | 1,52                   |
| Referenzgen<br>Gerste   Weizen               | 2,12                        | 0,00                   | 3,27                   | 1,37                   |
| Identifizierung <i>Phoma</i><br><i>betae</i> | 7,13                        | 7,97                   | 2,04                   | 0,00                   |
| Screening <i>Alternaria</i><br>Spezies       | 6,36                        | 8,65                   | 2,36                   | 0,00                   |
| Referenzgen<br>Zuckerrübe                    | 4,94                        | 3,48                   | 2,65                   | 0,00                   |
| <b>Summe</b>                                 | <b>22,07</b>                | <b>20,10</b>           | <b>12,46</b>           | <b>2,89</b>            |

Tabelle 32: Summierte Standardabweichung der Ct-Werte unter Verwendung von Extraktionspuffer 4 und 5 und Säulchen Typ 1 und 2 bezogen auf den optimalen Wert einer Messreihe

| Detektionssystem                             | Standardabweichung     |                        |                        |                        |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|  | EP 4<br>Säulchen Typ 1 | EP 4<br>Säulchen Typ 2 | EP 5<br>Säulchen Typ 1 | EP 5<br>Säulchen Typ 2 |
| Screening <i>Fusarium</i><br>Spezies         | 0,44                   | 0,22                   | 0,46                   | 0,04                   |
| Referenzgen<br>Gerste   Weizen               | 0,37                   | 0,23                   | 0,36                   | 0,15                   |
| Identifizierung <i>Phoma</i><br><i>betae</i> | 0,91                   | 0,28                   | 0,18                   | 0,14                   |
| Screening <i>Alternaria</i><br>Spezies       | 0,46                   | 0,53                   | 0,66                   | 0,47                   |
| Referenzgen<br>Zuckerrübe                    | 0,23                   | 0,24                   | 0,28                   | 0,24                   |
| <b>Summe</b>                                 | <b>2,40</b>            | <b>1,49</b>            | <b>1,93</b>            | <b>1,04</b>            |

Die in Tabelle 31 dargestellten Werte verdeutlichen, dass sich der Puffer EP 5 optimal für die Anwendung bei der DNA-Extraktion von Pathogenen sowohl von Gerste wie auch von Zuckerrübensaatgut eignete.

Auch wenn mit EP 4 unter Verwendung des Säulchens Typ 2 in Bezug auf die *Fusarium* Spezies und Gersten-DNA die besten Ergebnisse erzielt wurden, ergab diese Kombination in Bezug auf die Untersuchung von Zuckerrübenkontaminanten auf *Phoma betae* und *Alternaria* Spezies weniger gute Resultate. In diesem Fall bestanden zu große prozentuale Abweichungen vom Optimum. Gleiches galt für denselben Extraktionspuffer in Kombination mit Spin-Säulchen Typ 1.

Bezüglich des optimalen Extraktionssäulchens ließ sich die Wahl von Typ 2 durch die beiden niedrigsten Standardabweichungen, dargestellt in Tabelle 32, begründen. Auch in dieser Kombination konnten Vorteile von EP 5 erkannt werden.

## 5.5 Ergebnis der Evaluierung

Fazit der Versuche war, dass sich Extraktionspuffer EP 5 in Kombination mit Bindepuffer BP 2 unter Verwendung des Spin-Säulchens Typ 2 als optimal für die Anforderungen der DNA-Extraktion herausstellten. Daher wurde diese Kombination für die weiteren Versuche mit Praxisproben eingesetzt.

## 6 Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben

### 6.1 Aufbau der Versuche

Unter Verwendung der oben beschriebenen, in dieser Arbeit entwickelten DNA-Isolierungsmethode sowie des Multiplex Real-Time PCR Assays zum Nachweis von *Fusarium* Spezies bestand die Möglichkeit, Malzproben von Gerste und Weizen auf die Menge des *Fusarium* Spezies Besatzes hin zu untersuchen und diesen zu differenzieren. Daneben konnten mit der gleichen DNA-Isolierungsmethodik und dem zweiten Multiplex Real-Time PCR Assay auch Zuckerrübensaatzgutknäuel analysiert werden. Diese Ergebnisse werden hier jedoch nicht detailliert dargestellt, da es sich um Auftragsanalysen handelte und die erhobenen Daten vertraulich zwischen der PIKA Weihenstephan GmbH und dem Kunden ausgetauscht wurden.

Im Folgenden wird der Versuchsaufbau für die Untersuchung von Gersten- und Weizenmalzproben beschrieben. Von jeder Probe wurden drei Analysen durchgeführt. Neben den durchgeführten PCR-Analysen wurde im Brauereilabor des Kunden A das Gushingverhalten des Malzes nach modifiziertem Carlsbergtest ermittelt sowie der DON-Gehalt der Probe mittels ELISA gemessen. Von der für die Mykotoxinbestimmung vermahlenden Malzprobe wurde eine Teilmenge von ca. 100 g im Brauereilabor des Kunden A sofort nach dem Vermahlen entnommen und bis zur DNA-Isolierung bei -21°C gelagert. Dadurch sollten mögliche Veränderungen des Mikroorganismenbesatzes im Vorfeld der Messung ausgeschlossen werden.

Aus der geschroteten Probe wurden in der anschließenden Analyse nach dem Auftauen 100 mg zur DNA-Isolierung entnommen und analog zu dem in Abschnitt 5.1 aufgeführten Protokoll verarbeitet. Die Extraktion wurde unter Verwendung von Extraktionspuffer EP 5 in Kombination mit Bindepuffer BP 2 sowie des Säulchens Typ 2 durchgeführt. Wenn die DNA-Isolate nicht direkt analysiert werden konnten, wurden sie bis zur Messung bei -21°C gelagert. Für die Multiplex Real-Time PCR wurden jeweils 5 µl DNA-Eluat der Probe sowie 25 µl des in Tabelle 17 angegebenen Oligonukleotid-Mixes verwendet. Nach Auswertung der Messwerte wurden für jede Probe der Gesamtbelastungsindex *Fusarium* Spezies sowie der Belastungsindex der Gruppe der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies nach dem in Formel 5 und Formel 6 angegebenen Zusammenhang berechnet.

## 6.2 Vorversuche

### 6.2.1 Bestimmung der relativen Standardabweichung der Belastungsindizes

Jede Messung ist zwangsläufig mit einem Fehler behaftet. Für die hier durchgeführten Untersuchungen war dieser von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig, wie beispielsweise der Einwaage des Probenmaterials, der Pipettiergenauigkeit bei der DNA-Extraktion und dem Multiplex Real-Time PCR-Ansatz sowie der Messgenauigkeit des Real-Time PCR Thermocyclers. Alle Einflüsse in Summe beeinflussten den gemessenen Ct-Wert und damit einhergehend die daraus berechneten Belastungsindizes. Mit welchem Fehler die Belastungsindizes behaftet sind, sollte mit diesem Versuch bestimmt werden. Dazu wurde aus jeweils drei unterschiedlichen Gersten- und Weizenmalzschrotproben in drei unabhängigen Ansätzen DNA isoliert und im Anschluss eine Multiplex Real-Time PCR-Analyse aller Proben durchgeführt.

Des Weiteren sollte dieser Versuch Aufschluss darüber geben, ob eine Korrelation zwischen der über die gemessenen Ct-Werte berechneten Menge an Getreide-DNA und der Menge an DNA der beiden Gruppen von *Fusarium* Spezies bestand.

Die zu einer Probe gehörenden Daten wurden immer in gleicher Form aufbereitet; alle Daten sind in Tabelle 33 bis Tabelle 38 zusammengestellt. Zum Aufbau der Tabellen:

- Spalte 1: Bezugsgröße zu den dargestellten Werten
- Spalte 2: Gemessene Ct-Werte je Ansatz und die daraus berechneten Größen: DNA-Menge, Belastungsindizes und Korrelationskoeffizienten der jeweilig ermittelten *Fusarium* DNA-Menge und zugehörigen Getreide DNA-Menge
- Spalte 3: Statistische Betrachtung der Messwerte und der daraus berechneten Größen: Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}_{arithmetisch}$ ), Standardabweichung ( $\sigma_x$ ) und relative Standardabweichung (Vark)

Formel 7: Arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x}_{arithmetisch} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

Formel 8: Standardabweichung

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$



Formel 9: Relative Standardabweichung

$$VarK = \frac{\sigma_x}{\bar{x}}$$

Die relative Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient ist die prozentuale Abweichung der Standardabweichung vom Mittelwert. Da alle Proben eine unterschiedlich hohe Ausgangsbelastung mit *Fusarium* Spezies aufwiesen, eignete sich diese besonders gut für die Analyse. In den Tabellen 33 bis 35 sind die Resultate für Gerstenmalz, in den Tabellen 36 bis 38 für Weizenmalz aufgeführt.

Tabelle 33: Untersuchung Gerstenmalz – Probe 1: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

| Probe 1 GERSTENMALZ                 |                              |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 23,04                        | 23,35    | 23,39    | 23,26      | 0,19  | 0,82       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 21,80                        | 21,82    | 22,18    | 21,93      | 0,21  | 0,98       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 23,68                        | 24,37    | 24,07    | 24,04      | 0,35  | 1,44       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,49                         | 0,40     | 0,38     | 0,42       | 0,06  | 13,57      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 1,41                         | 1,39     | 1,09     | 1,30       | 0,18  | 13,79      |
| Getreide                            | 182,35                       | 114,21   | 139,98   | 145,51     | 34,40 | 23,64      |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 2,68                         | 3,46     | 2,75     | 2,96       | 0,43  | 14,59      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 7,75                         | 12,20    | 7,81     | 9,25       | 2,55  | 27,61      |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             | 0,89                         |          |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  | 0,19                         |          |          |            |       |            |

Tabelle 34: Untersuchung Gerstenmalz – Probe 2: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

|                                     | Probe 2 GERSTENMALZ          |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 24,05                        | 23,45    | 23,94    | 23,81      | 0,32  | 1,34       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 20,92                        | 20,73    | 21,02    | 20,89      | 0,15  | 0,71       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 24,86                        | 24,60    | 24,23    | 24,56      | 0,32  | 1,29       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,24                         | 0,37     | 0,26     | 0,29       | 0,07  | 22,92      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 2,56                         | 2,91     | 2,39     | 2,62       | 0,26  | 10,07      |
| Getreide                            | 81,93                        | 97,72    | 125,59   | 101,74     | 22,11 | 21,73      |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 2,99                         | 3,78     | 2,10     | 2,96       | 0,84  | 28,39      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 31,22                        | 29,75    | 19,04    | 26,67      | 6,65  | 24,94      |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             |                              | -0,01    |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  |                              | -0,46    |          |            |       |            |

Tabelle 35: Untersuchung Gerstenmalz – Probe 3: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

|                                     | Probe 3 GERSTENMALZ          |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 25,40                        | 25,33    | 26,01    | 25,58      | 0,37  | 1,46       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 22,59                        | 22,86    | 23,33    | 22,93      | 0,37  | 1,63       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 23,81                        | 23,69    | 23,63    | 23,71      | 0,09  | 0,39       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,10                         | 0,10     | 0,06     | 0,09       | 0,02  | 23,60      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 0,83                         | 0,69     | 0,50     | 0,67       | 0,16  | 24,25      |
| Getreide                            | 166,96                       | 181,11   | 188,63   | 178,90     | 11,00 | 6,15       |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,58                         | 0,56     | 0,34     | 0,49       | 0,13  | 27,31      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 4,97                         | 3,82     | 2,67     | 3,82       | 1,15  | 30,10      |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             |                              | -0,69    |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  |                              | -0,97    |          |            |       |            |

Tabelle 36: Untersuchung Weizenmalz – Probe 1: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

|                                     | Probe 1 WEIZENMALZ           |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 22,46                        | 22,43    | 23,05    | 22,65      | 0,35  | 1,54       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 20,97                        | 20,86    | 20,71    | 20,85      | 0,13  | 0,63       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 23,39                        | 23,11    | 23,10    | 23,20      | 0,16  | 0,71       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,73                         | 0,74     | 0,49     | 0,65       | 0,14  | 22,14      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 2,47                         | 2,66     | 2,95     | 2,69       | 0,24  | 8,85       |
| Getreide                            | 221,97                       | 268,37   | 270,20   | 253,51     | 27,33 | 10,78      |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 3,28                         | 2,77     | 1,80     | 2,62       | 0,75  | 28,78      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 11,14                        | 9,92     | 10,91    | 10,66      | 0,65  | 6,06       |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             | -0,48                        |          |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  | 0,82                         |          |          |            |       |            |

Tabelle 37: Untersuchung Weizenmalz – Probe 2: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

|                                     | Probe 2 WEIZENMALZ           |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 24,20                        | 23,52    | 23,50    | 23,74      | 0,40  | 1,68       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 24,08                        | 23,43    | 23,20    | 23,57      | 0,46  | 1,94       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 24,08                        | 24,01    | 23,15    | 23,75      | 0,52  | 2,18       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,22                         | 0,35     | 0,36     | 0,31       | 0,08  | 24,91      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 0,30                         | 0,47     | 0,55     | 0,44       | 0,13  | 28,52      |
| Getreide                            | 139,03                       | 145,79   | 261,19   | 182,00     | 68,66 | 37,73      |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 1,59                         | 2,41     | 1,37     | 1,79       | 0,55  | 30,86      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 2,18                         | 3,23     | 2,11     | 2,51       | 0,63  | 24,99      |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             | 0,57                         |          |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  | 0,78                         |          |          |            |       |            |

Tabelle 38: Untersuchung Weizenmalz – Probe 3: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen

|                                     | Probe 3 WEIZENMALZ           |          |          |            |       |            |
|-------------------------------------|------------------------------|----------|----------|------------|-------|------------|
|                                     | Gemessene Ct-Werte           |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
|                                     | Ansatz 1                     | Ansatz 2 | Ansatz 3 |            |       |            |
| Toxinbildner (FAM Kanal)            | 25,93                        | 26,17    | 26,35    | 26,15      | 0,21  | 0,81       |
| <i>Fusarium</i> Spezies (HEX Kanal) | 26,27                        | 26,63    | 26,34    | 26,41      | 0,19  | 0,72       |
| Getreide (BODIPY Kanal)             | 23,43                        | 23,42    | 22,96    | 23,27      | 0,27  | 1,15       |
|                                     | Berechnete DNA-Menge [ng]    |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,07                         | 0,06     | 0,05     | 0,06       | 0,01  | 14,56      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 0,07                         | 0,05     | 0,07     | 0,06       | 0,01  | 12,44      |
| Getreide                            | 216,03                       | 217,50   | 297,10   | 243,54     | 46,39 | 19,05      |
|                                     | Berechnete Belastungsindizes |          |          | Mittelwert | STABW | rel. STABW |
| Toxinbildner                        | 0,31                         | 0,26     | 0,17     | 0,25       | 0,07  | 29,02      |
| <i>Fusarium</i> Spezies             | 0,32                         | 0,25     | 0,22     | 0,26       | 0,05  | 19,18      |
|                                     | Korrelation DNA-Menge        |          |          |            |       |            |
| Toxinbildner / Getreide             | -0,81                        |          |          |            |       |            |
| <i>Fusarium</i> Spezies / Getreide  | 0,30                         |          |          |            |       |            |

Für den Vergleich und die Bewertung der in den Tabellen 33 bis 38 aufgeführten Ergebnisse wurde die relative Standardabweichung herangezogen. Diese bewegte sich für die gemessenen Ct-Werte sowohl bei Gersten- als auch bei Weizenmalz unabhängig von den drei Messwerten immer unter 2,5 %. Obwohl die Abweichung sehr gering erschien, hatte diese doch erhebliche Auswirkungen auf die relative Standardabweichung der aus den Ct-Werten berechneten Belastungsindizes. Begründet werden konnte dies mit der Tatsache, dass zur Ermittlung der DNA-Menge im Ausgangsprobenmaterial der gemessene Ct-Wert exponential in die Berechnung eingeht. Die zugehörigen Daten sind graphisch in Abbildung 28 aufbereitet.

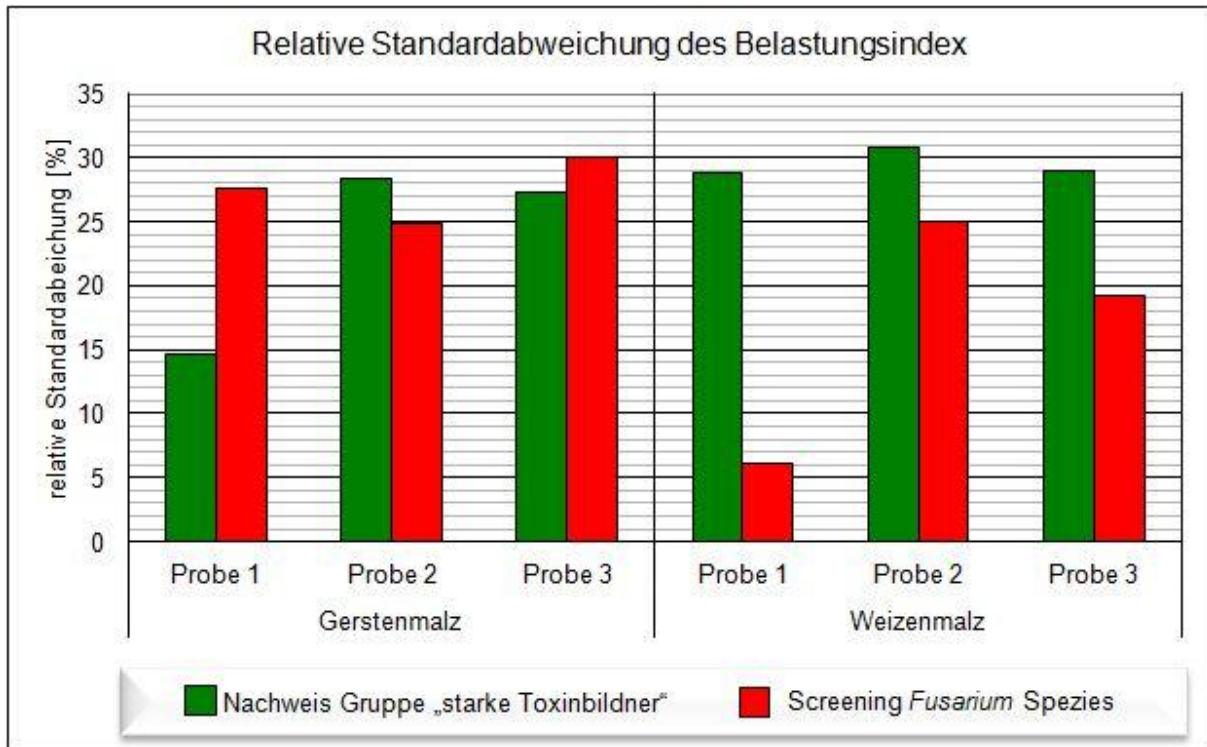


Abbildung 28: Relative Standardabweichung der Belastungsindizes in Abhängigkeit von der untersuchten Malzart und der jeweiligen *Fusarium*-Gruppe

Aus Abbildung 28 wird ersichtlich, dass sich keine generelle Aussage über die Höhe der relativen Standardabweichung in Bezug auf die beiden Gruppen der untersuchten *Fusarium* Spezies ableiten ließ. Ebenso wenig war die berechnete Größe von der untersuchten Malzart, in diesem Fall Gersten- oder Weizenmalz abhängig. Die relative Standardabweichung bewegte sich für die toxinbildenden *Fusarium* Spezies zwischen 14,6 % und 30,1 %, für die Gesamtmenge an *Fusarium* Spezies nahm sie Werte zwischen 5,2 % und 6,1 % an.

### 6.2.2 Bestimmung der Korrelationskoeffizienten

Die ermittelten Messwerte in Abschnitt 6.2.1 wurden einer weiteren Analyse unterzogen. Dazu wurde der Korrelationskoeffizient zwischen der Menge extrahierter *Fusarium* Spezies DNA und Getreide-DNA der drei Parallelproben bestimmt. Diese Daten sind graphisch aufbereitet in Abbildung 29 dargestellt.

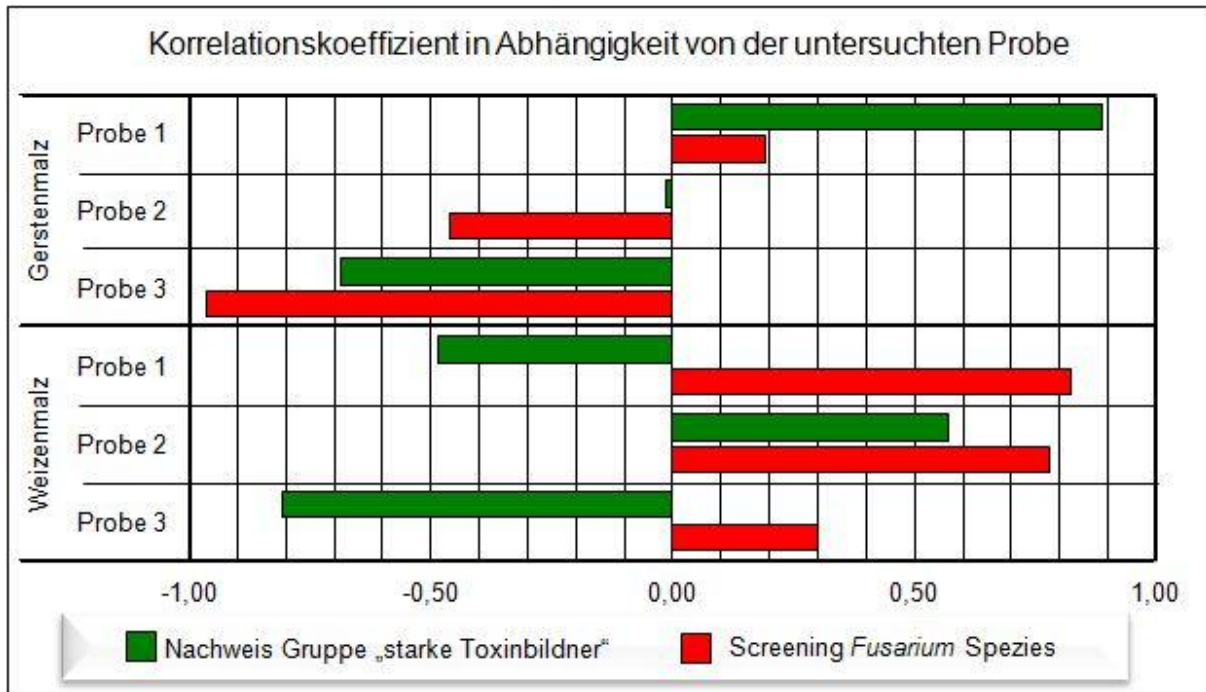


Abbildung 29: Korrelationskoeffizienten der extrahierten DNA-Mengen in Abhängigkeit von der untersuchten Malzart und der jeweiligen *Fusarium*-Gruppe

Anhand der berechneten und in Abbildung 29 dargestellten Korrelationskoeffizienten konnte kein Zusammenhang zwischen der isolierten Menge an Getreide-DNA und der Menge an DNA der beiden untersuchten Gruppen von *Fusarium* Spezies festgestellt werden. Die Koeffizienten zeigten von einer stark positiven, über keine bis hin zu einer negativen Ausprägung die komplette Bandbreite für die beiden Untersuchungsgegenstände. Zwei Proben (Gerstenmalz 1 und Weizenmalz 2) wiesen für beide untersuchten Gruppen von *Fusarium* Spezies einen positiven Korrelationskoeffizienten auf, wenngleich dieser stark in seiner Höhe variierte.

Besonders auffällig war speziell bei den beiden Weizenmalzproben 1 und 3 der konträr verlaufende Zusammenhang. Die DNA-Menge des gesamten *Fusarium* Spezies Besatzes wies im Vergleich mit der Getreide DNA-Menge eine schwach (Probe 3) bis stark (Probe 1) positive Korrelation auf. Hingegen ist diese Beziehung bei Betrachtung der DNA-Menge der Gruppe der starken Toxinbildner zur Getreide-DNA Menge negativ ausgeprägt.

Zudem wurde bei den Gerstenmalzproben 2 und 3 eine von schwach bis stark negativ ausgeprägte Verknüpfung der beiden Untersuchungsgegenstände festgestellt.

### 6.2.3 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der Vorversuche

Die durchgeführten Vorversuche lieferten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Auswertung und Interpretation der nachfolgend ermittelten Messwerte. Grundsätzlich galt zu beachten, dass sich die relative Standardabweichung auf den Mittelwert der drei Parallelansätze einer Probe bezieht, während mittels Korrelationskoeffizienten die drei Ansätze einer Probe direkt miteinander verglichen wurden. Deshalb mussten die Folgerungen, die aus beiden Werten gezogen wurden, auch differenziert betrachtet werden.

Mittels Korrelationskoeffizienten konnten die Messwerte der einzelnen Ansätze einer Probe miteinander verglichen werden. Theoretisch wurden immer 100 mg einer vermahlenden Malzprobe zur Extraktion der DNA verwendet, praktisch liegen hier allerdings Abweichungen vor. Um Fehler beim Einwiegen zu kompensieren, wurde neben dem Besatz an *Fusarium* Spezies auch ein Referenzgen aus Gerste bzw. Weizen bestimmt. Dadurch war es möglich, für jede Probe die Menge an extrahierter Getreide-DNA zu bestimmen und darauf die DNA-Menge der jeweils gemessenen *Fusarium* Gruppe zu beziehen. Die DNA-Menge wurde über den gemessenen Ct-Wert berechnet.

Mit steigender Getreide DNA-Menge, folglich einer höheren Einwaage, sollte auch eine höhere Menge an DNA der Pathogenen vorliegen, vorausgesetzt die Effizienz der DNA-Isolierung war in allen Fällen gleich.

Anhand der hier durchgeführten Vorversuche konnte diese These jedoch nur teilweise bestätigt werden. Zunächst beeinflussten auch die oben genannten Faktoren für die relative Standardabweichung den Korrelationskoeffizienten. Hier ist unter anderem die Pipettiergenauigkeit zu beachten, da von der DNA-Extraktion bis zur Messung der Probe 11 Pipettiervorgänge durchzuführen waren. Daneben dürfte insbesondere die inhomogene Verteilung der DNA innerhalb des Getreidekorns Auswirkungen auf die Messung haben. Im Vergleich zum Rest des Kornes konzentriert sich im Keimling die höchste Menge an Pflanzen-DNA. Bei einer Einwaage von 100 mg Probenmaterial kann dieser Sachverhalt einen erheblichen Einfluss auf die Gesamtmasse an DNA haben, welche aus der Getreideprobe extrahiert wurde (vgl. Tabelle 33 bis Tabelle 38, berechnete DNA-Menge [ng] Getreide). Zwei Faktoren hätten in diesem Zusammenhang unter Umständen Abhilfe schaffen können. Zum einen hätte eine größere Schrotmenge zu Beginn der Extraktion eingesetzt werden können.

Zum anderen wäre damit einhergehend eine Verlängerung der Inkubationszeit des Extraktionsschritts denkbar gewesen (Edwards *et al.*, 2001). Durch Modifikation des entwickelten DNA-Isolierungsprotokolls wären beide Möglichkeiten umsetzbar gewesen, allerdings hätten diese wiederum im Gegensatz zu den Prämissen bei der Erarbeitung des DNA-Extraktionsprotokolls gestanden (vgl. Abschnitt 7.2). Zudem war die Verarbeitung größerer Einwaagen aufgrund der zur Verfügung stehenden Laborgerätschaften im Laufe dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Bei Vergleich der berechneten relativen Standardabweichungen für die einzelnen Belastungsindizes stellte sich heraus, dass diese unabhängig von der untersuchten Malzart sowie der jeweiligen Bezugsgruppe (*Fusarium* Spezies gesamt bzw. die Gruppe der stark Toxinbildenden) zu sein schienen. Ebenso wenig wurde diese Größe davon beeinflusst, ob eine Probe besonders hoch (vgl. Tabelle 34) oder aber besonders niedrig (vgl. Tabelle 38) mit *Fusarium* Spezies belastet war. Die relative Standardabweichung des Belastungsindex war aber sowohl vom gemessenen Ct-Wert der jeweiligen Gruppe von Pathogenen abhängig als auch vom Ct-Wert für das Referenzgen aus Gerste bzw. Weizen. Damit wurde die Größe dieses Werts neben der Pipettiergenauigkeit auch entscheidend von der Performance und der Auswertungssoftware des Real-Time PCR Thermocyclers beeinflusst. Wie aus den Tabellen 33 bis 38 hervorgeht, führten geringe Abweichungen des Ct-Werts zu erheblichen Unterschieden der daraus berechneten DNA-Menge. Diesem Sachverhalt wurde in der Form Rechnung getragen, dass alle Belastungsindizes der Praxisproben mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt wurden (vgl. Abbildung 28).

### **6.3 Ergebnisse aus der Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben**

Bei den analysierten Praxisproben handelte es sich um 273 Malzproben, davon 172 Gersten- und 101 Weizenmalzproben, die nahezu über den gesamten Zeitraum des Jahres 2006 von Brauerei Kunde A zur Verfügung gestellt wurden. Für alle nachfolgend aufgeführten Proben wurden vier Analysenwerte ermittelt. Gushingverhalten und DON-Gehalt wurden im Brauereilabor des Kunden A bestimmt, die beiden Belastungsindizes wurden in dieser Arbeit ermittelt und im Anschluss den beiden anderen Werten gegenübergestellt. Beim Vergleich der Daten galt es zu prüfen, ob möglicherweise ein Zusammenhang aus einem oder sogar beiden Belastungsindizes im Hinblick auf das Gushingverhalten des Malzes bzw. den DON-Gehalt des Malzes



abgeleitet werden konnte. Nach durchgeführter Analyse im Brauereilabor des Kunden A wurden die Proben gegliedert, je nachdem ob positives oder negatives Gushingverhalten vorlag. In Kombination mit einem DON-Gehalt größer bzw. kleiner der Nachweisgrenze von 111 ppb ergaben sich dadurch vier Kategorien. Die nachfolgende Abbildung 30 zeigt die einzelnen Kategorien sowie die nach Gersten- und Weizenmalzproben aufgeteilte Ergebnisverteilung.

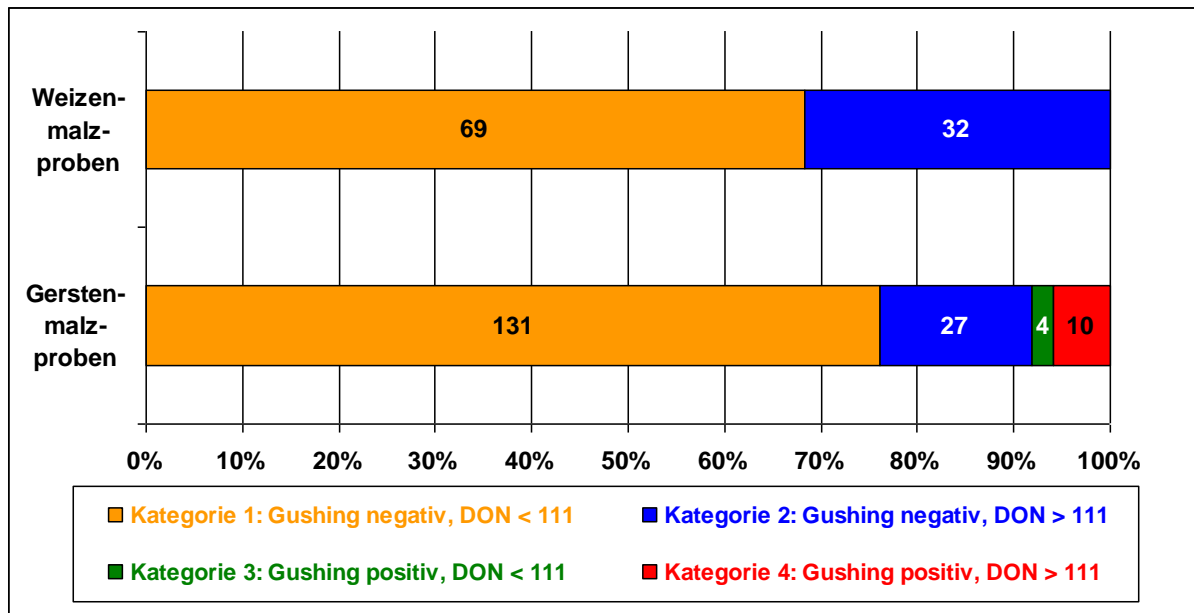


Abbildung 30: Einteilung der untersuchten Malzproben in die Kategorien: 1 - Gushing negativ; DON < 111 ppb; 2 - Gushing negativ; DON > 111 ppb; 3 - Gushing positiv; DON < 111 ppb; 4 - Gushing positiv; DON > 111 ppb

Sowohl für die untersuchten Gersten- als auch Weizenmalzproben fand sich jeweils der größte Anteil in Kategorie 1 wieder. Diese Gruppe beinhaltet Proben, bei denen kein Gushing vorlag, einhergehend mit einem DON-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 111 ppb. Diese insgesamt 200 Proben waren daher als unkritisch einzustufen. Daneben zeigten etwa 32 % der Weizenmalzproben einen DON-Wert über der Nachweisgrenze, Gushing konnte jedoch nicht festgestellt werden. Proben mit diesen Merkmalen wurden der Kategorie 2 zugeordnet. Für die analysierten Gerstenmalzproben betrug der Anteil in Kategorie 2 ca. 15 %.

In Kategorie 3 wurden Proben mit positivem Gushingverhalten und gleichzeitig einem DON-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 111 ppb eingeordnet. Lediglich vier Gerstenmalzproben fielen in diese Gruppe.

Die Charakteristika der Kategorie 4 waren positives Gushingverhalten einhergehend mit einer messbaren DON-Belastung. Auch dieser Kategorie konnten im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung nur Gerstenmalze zugeordnet werden. Insgesamt zeigten zehn Proben dieses Muster. Alle zu den Proben gehörigen Daten sind im Anhang E1 bis E6 separat aufgeführt.

Zunächst werden die Proben der Kategorie 1 einer detaillierten Betrachtung unterzogen. Um die in den nachfolgenden Abbildung 31 bis Abbildung 35 gezeigten Daten einfach miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils dieselbe Ordinatenkalibrierung, ausgehend vom maximalen Belastungsindex gewählt. Dargestellt sind die Indexwerte je Probe für die Belastung mit *Fusarium* Spezies der stark toxinbildenden Gruppe sowie für die Gesamtbelastung an *Fusarium* Spezies. Die Gliederung der Proben erfolgt anhand steigender Werte für die Gruppe der starken Toxinbildner.

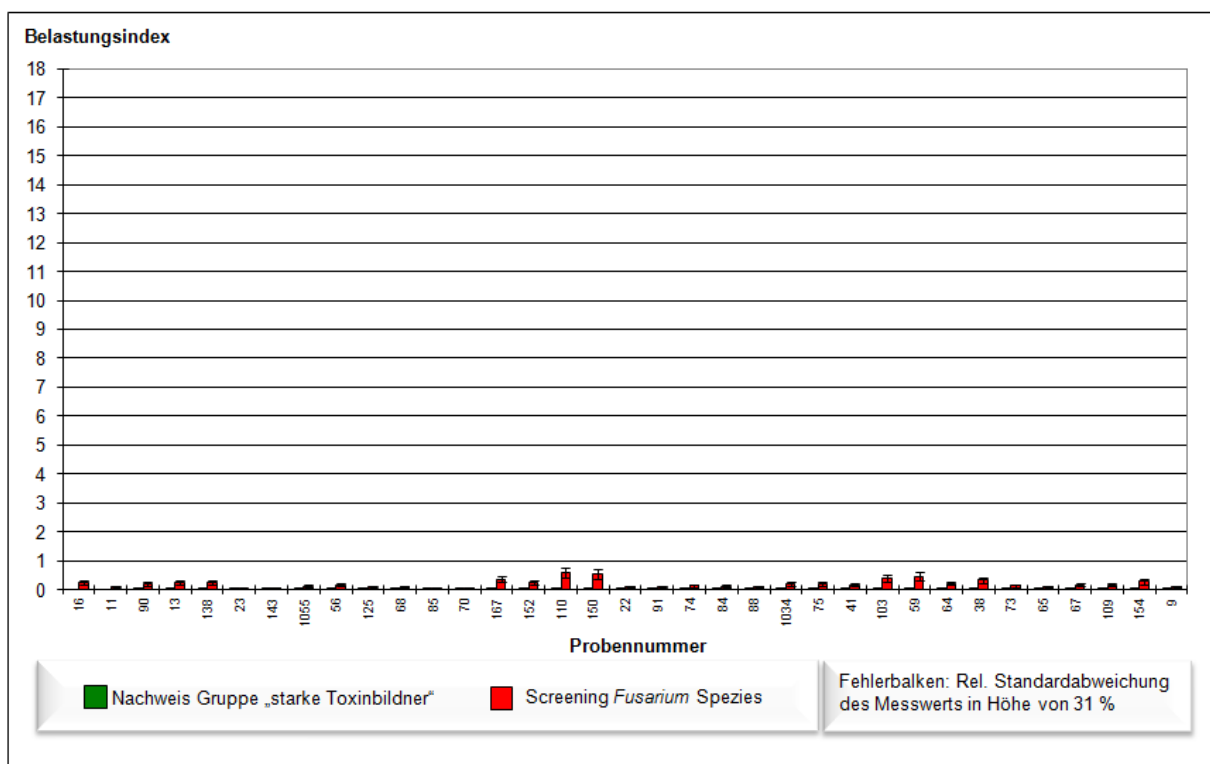


Abbildung 31: Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies - Teil 1 von 2 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

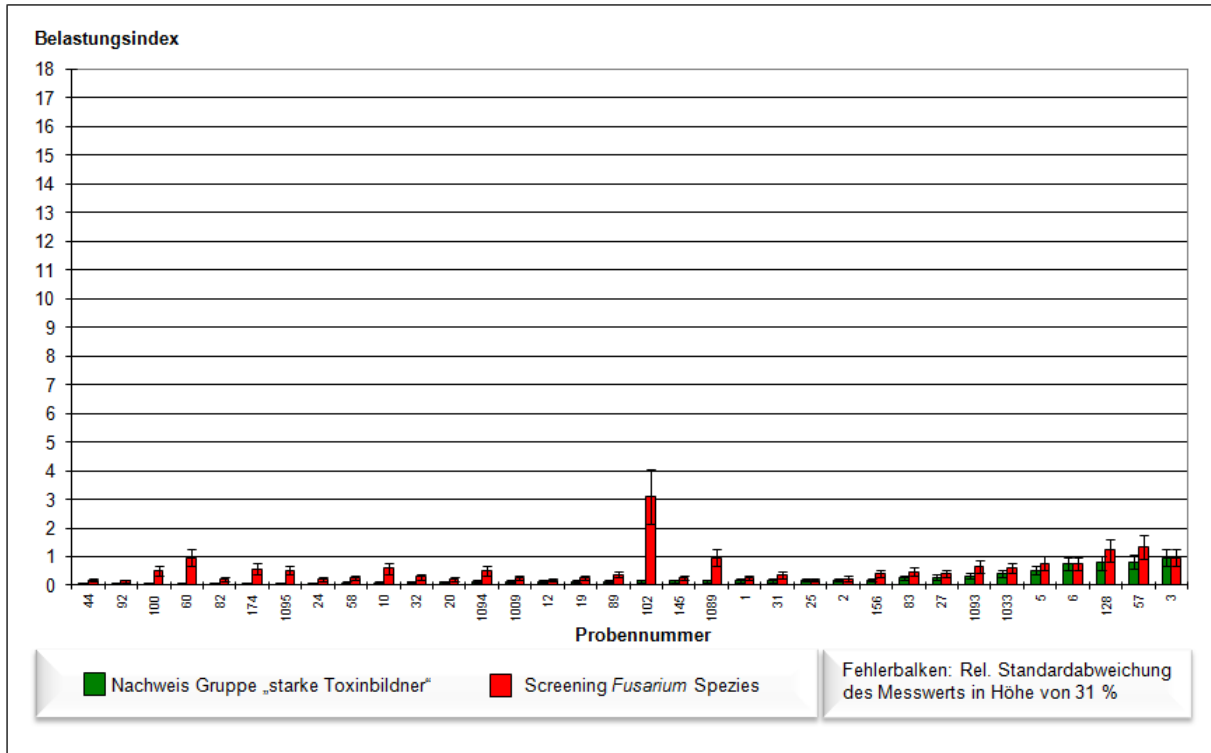


Abbildung 32: Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies - Teil 2 von 2 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

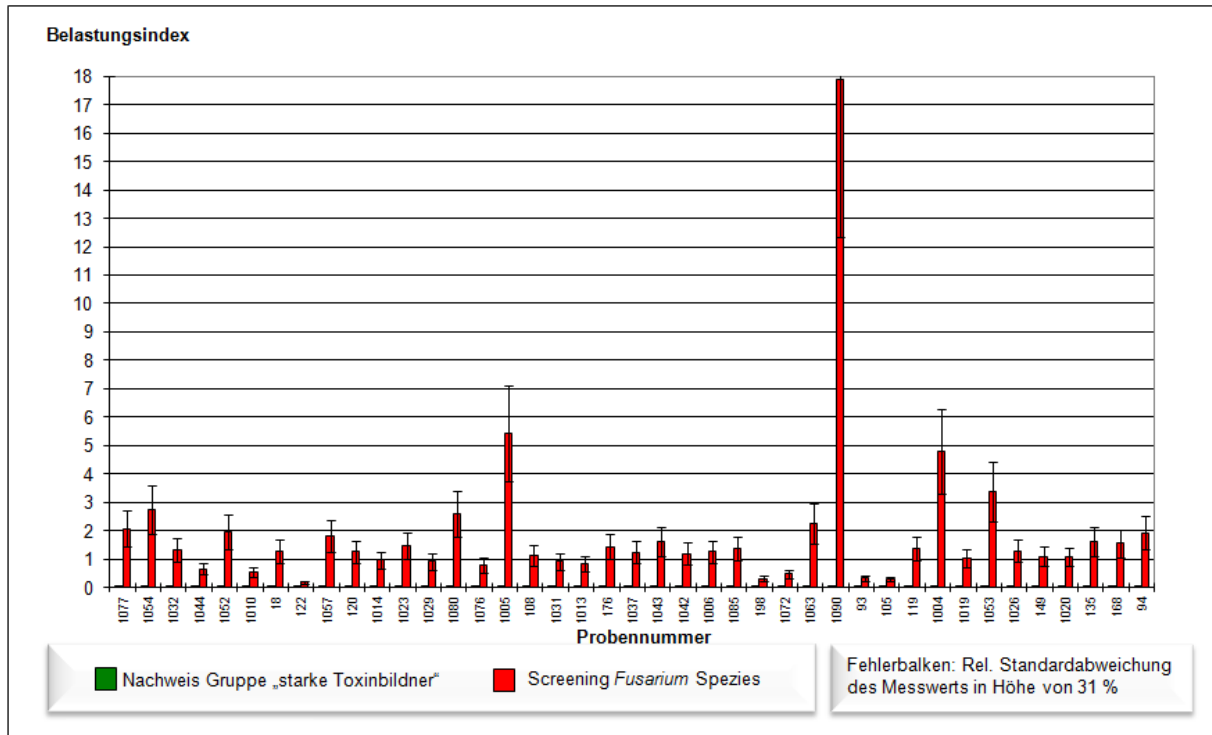


Abbildung 33: Belastungsindex der untersuchten Gerstenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies - Teil 1 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

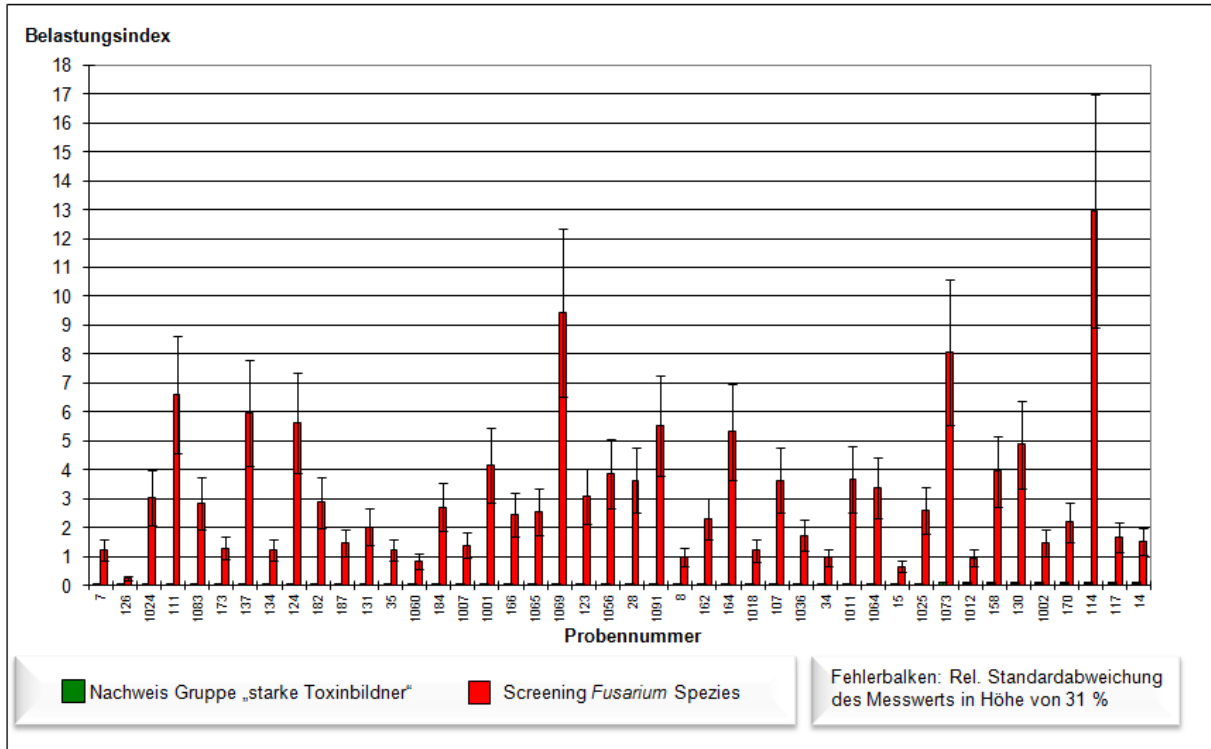


Abbildung 34: Belastungsindex der untersuchten Gerstenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies - Teil 2 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

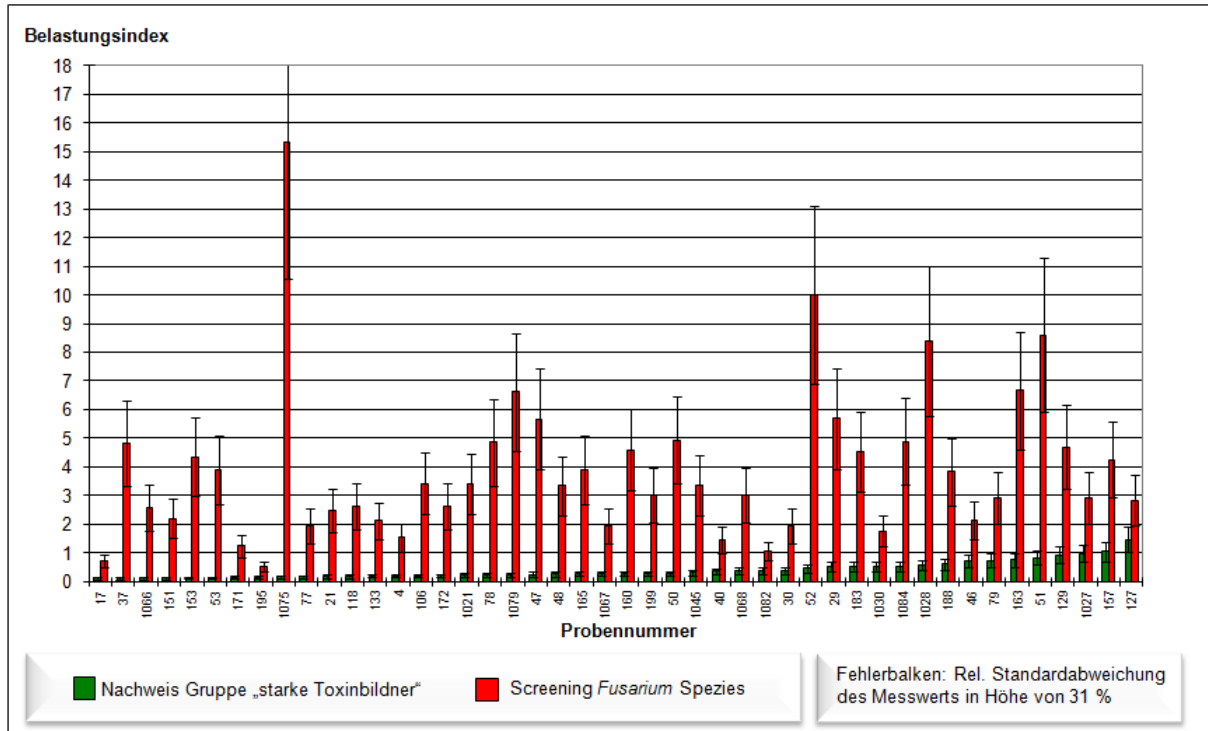


Abbildung 35: Belastungsindex der untersuchten Gerstenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies - Teil 3 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

Zwischen den untersuchten Weizen- und Gerstenmalzproben waren deutliche Unterschiede bezüglich der Belastung zu erkennen. Die Gesamtbelastung an *Fusarium* Spezies war bei den Weizenmalzproben im Durchschnitt deutlich geringer als bei den Gerstenmalzproben. Während beim Weizenmalz lediglich Probe 102 mit einem relativ hohen Belastungsindex von 3,11 (vgl. Abbildung 31) auffiel, überschritten beim Gerstenmalz 43 Proben diesen Wert, zum Teil sogar sehr deutlich mit Werten bis zu 17,87 (vgl. Abbildung 33 Probe 1090). Gerade bei den Gerstenmalzproben war erkennbar, dass große Schwankungen innerhalb der Gesamtbelastung vorlagen. Dennoch bewegten sich alle DON-Werte unterhalb der Nachweisgrenze, Gushing konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Diese Beobachtungen konnten für den Belastungsindex der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies nicht gemacht werden. Lediglich die in Abbildung 35 dargestellten Proben 127 und 157 des Gerstenmalzes überschritten einen Indexwert von 1, alle anderen 198 Proben lagen unter diesem Wert. Unter den gleichen Gesichtspunkten wurden auch die Proben der Kategorie 3 in Abbildung 36 betrachtet.

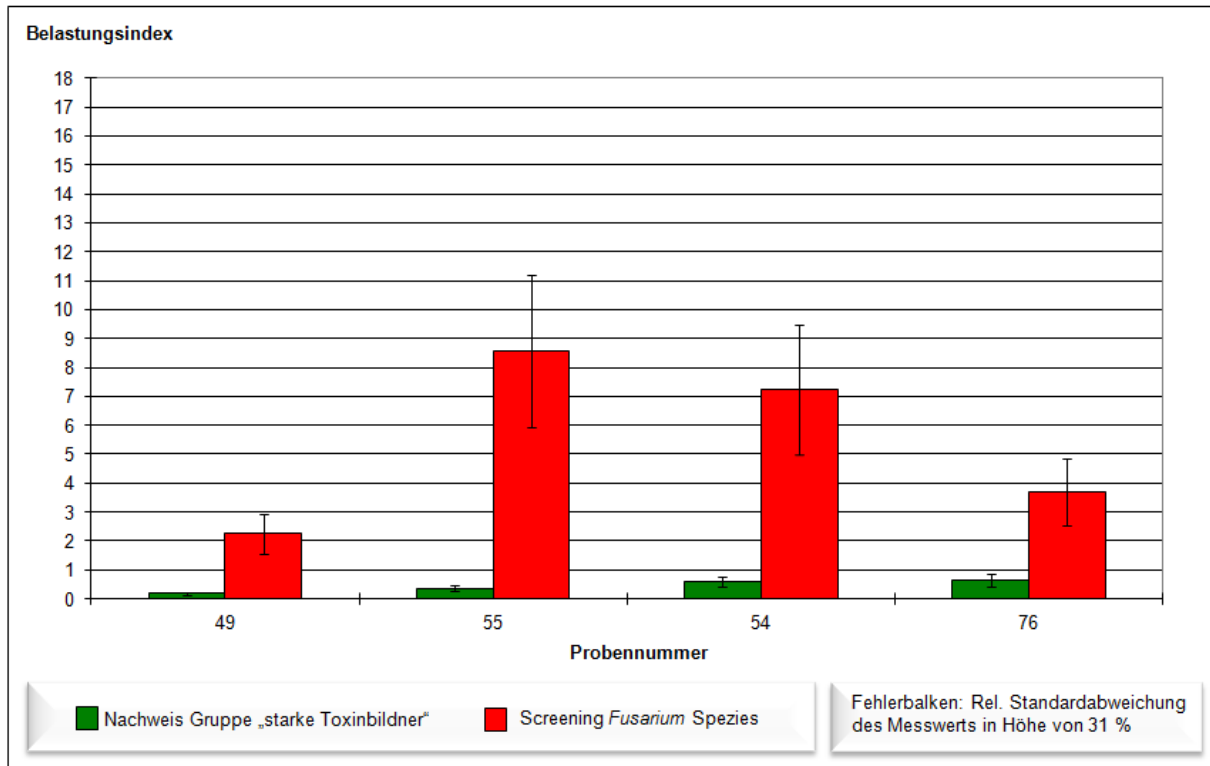


Abbildung 36: Belastungsindex der untersuchten Gerstenmalzproben in Kategorie 3 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

Für diese vier Proben trafen die gleichen Beobachtungen wie für die Proben der Kategorie 1 des Gerstenmalzes zu. Der Belastungsindex für die gesamten *Fusarium* Spezies nahm zwar hohe Werte zwischen 2,25 und 8,56 an, hingegen lag der Belastungsindex für die stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies deutlich unter 1. Damit unterscheiden sich diese Proben hinsichtlich der beiden Belastungsindizes nicht von denen der Kategorie 1. Allerdings war zu beachten, dass bei den Proben der Kategorie 3 ein positiver Gushingbefund festgestellt wurde.

Im Gegensatz zu den Kategorien 1 und 3 konnte für die Proben der Kategorien 2 und 4 ein DON-Gehalt über der Nachweisgrenze von 111 ppb gemessen werden. Die folgenden Diagramme sind deshalb zusätzlich mit einer sekundären Ordinate versehen, auf der der Gehalt dieses Leittoxins in ppb abgebildet ist. Daneben sind zur vereinfachten Orientierung zwei farbige Linien eingezeichnet, die blaue bei einem Belastungsindex von 1 und die orange bei einem Mykotoxingehalt von 175 ppb. Zusätzlich zu den Belastungsindizes wurde für jede Probe der zugehörige DON-Gehalt aufgetragen.

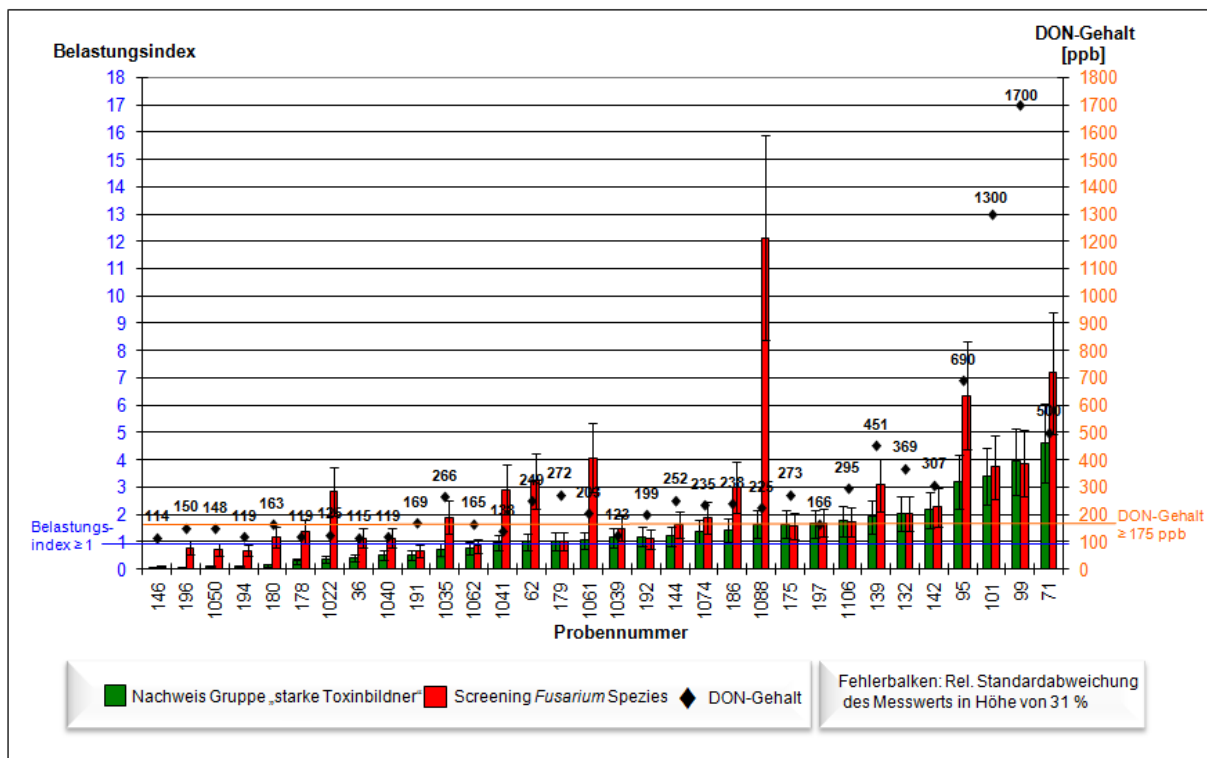


Abbildung 37: Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 2 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).



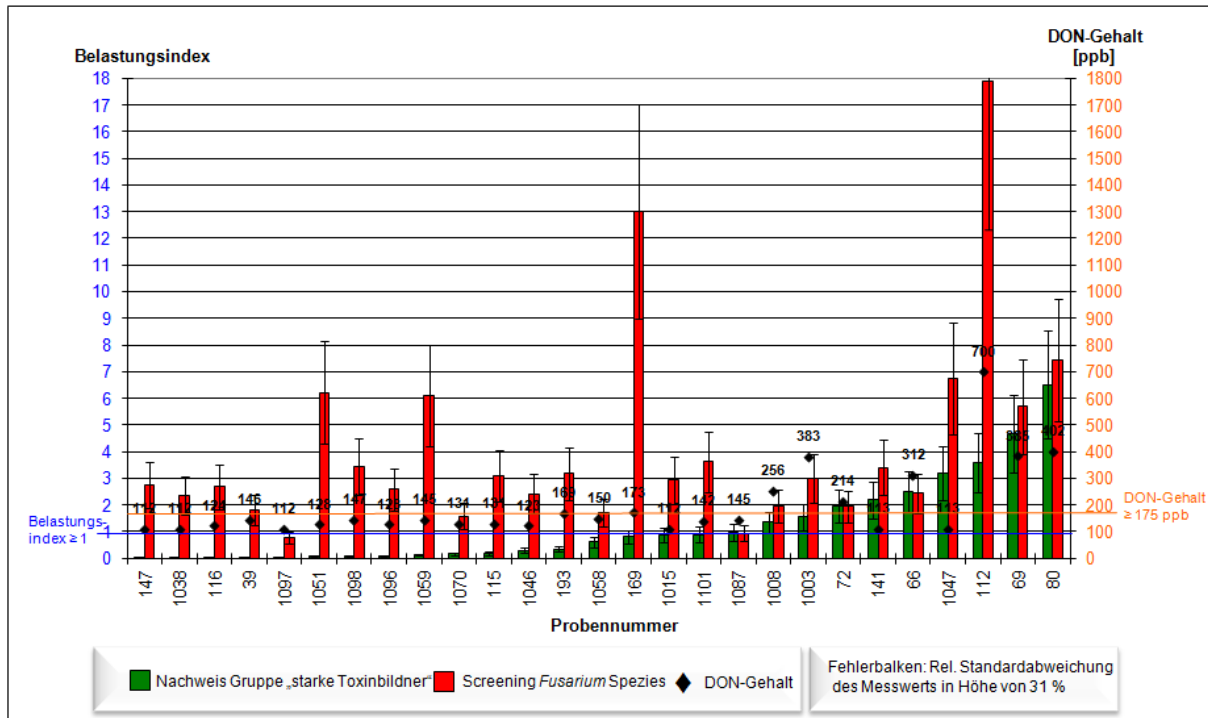


Abbildung 38: Belastungsindex der untersuchten Gerstenmalzproben in Kategorie 2 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

Nach Analyse der Messdaten wurde die These aufgestellt, dass bei einem Belastungsindex der stark toxinbildenden *Fusarium* Gruppe  $\geq 1$  der DON-Gehalt der Probe  $\geq 175$  ppb ist. Bei Betrachtung der Resultate unter diesem Gesichtspunkt ergaben sich für die Weizenmalzproben bei einem Gesamtumfang von 32 Proben (vgl. Abbildung 37) eine gute Übereinstimmung. Lediglich für drei Proben ergaben sich Abweichungen: Eine falsch positive Einstufung für Probennummer 266 und zwei falsche negative Aussagen (Probennummer 1039 und 197).

Bei den Gerstenmalzproben war diese These für 25 der 27 untersuchten positiven Proben richtig (vgl. Abbildung 38). Abweichungen ergaben sich für zwei Proben mit einer „falsch negativer Bewertung“ (Probennummer 141 und 1047).

Weiterhin ist hervorzuheben, dass der Gesamtbelastungsindex für die Weizenproben der Kategorie 2 (mit DON-Gehalt über 111 ppb) im Mittel mit 2,48 deutlich höher lag als der der Proben aus Kategorie 1 (kein messbarer DON-Gehalt) mit durchschnittlich 0,38. Für die Gerstenmalzproben war die gleiche Tendenz zu beobachten, wenngleich die Differenz zwischen beiden Werten weniger stark ausgeprägt war. Der Gesamtbelastungsindex nahm für Kategorie 2 einen gemittelten Wert von 4,14 an, während in Kategorie 1 diesbezüglich 3,03 gemessen wurde.

Proben, die den Kriterien der Kategorie 4 entsprachen, folglich ein positives Gushingverhalten und gleichzeitig einen messbaren DON-Gehalt aufwiesen, wurden nur im Bereich des Gerstenmalzes gefunden. Auch hier wurden die oben festgelegten Werte für den Belastungsindex der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies, mit  $\geq 1$  und einem DON-Gehalt  $\geq 175$  ppb zur Analyse angewandt. Die Daten sind in Abbildung 39 wiedergegeben. Die Ordinatenkalierung für den Belastungsindex ist analog zu den vorangegangenen Abbildungen gewählt. Lag der maximale Gesamtbelastungsindex einer Probe über 18, so ist der tatsächliche Belastungsindex in roten Zahlen über dem Balken aufgeführt.

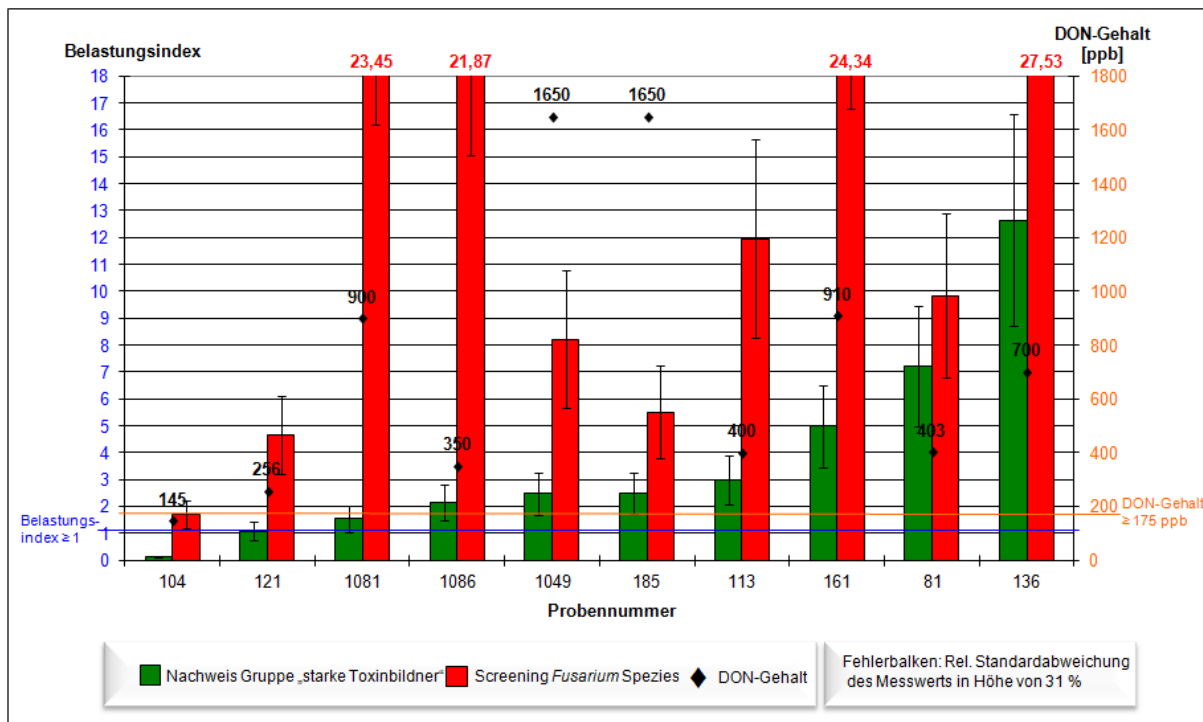


Abbildung 39: Untersuchung der Gerstenmalzproben der Kategorie 4 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).

Wie aus der Abbildung 39 hervorgeht, folgen die Messwerte dieser Proben der aufgestellten These, dass bei einem Belastungsindex  $\geq 1$  für die Gruppe der starken Toxinbildner ebenfalls ein DON-Gehalt  $\geq 175$  ppb gemessen wird. Ausreißer gab es innerhalb der zehn Proben umfassenden Gruppe nicht. Für den Gesamtbelastungsindex wurde ein Mittelwert von 13,91 berechnet, der deutlich über dem der anderen Kategorien lag.

Letztlich galt es noch zu prüfen, ob die DON-Belastung einer Probe in einem Zusammenhang mit dem Belastungsindex der drei *Fusarium* Spezies der stark toxinbildenden Gruppe stand. Dazu wurden die Messwerte zunächst nach Gersten- und Weizenmalzproben gegliedert und folgendermaßen verrechnet:

- Isolierte DNA-Menge der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies bezogen auf die Einwaage von 100 mg Schrot im Vergleich zur DON-Menge
- Belastungsindex der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies im Vergleich zur DON-Menge

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils die Abhängigkeit der aus den Messwerten berechneten DNA-Menge (vgl. Abbildung 40 bis Abbildung 43) bzw. Belastungsindex „starke Toxinbildner“ zum DON-Gehalt einer Probe. Die zugehörige Regressionsgerade mit Geradengleichung und linearem Regressionskoeffizient ist ebenfalls in der jeweiligen Abbildung dargestellt.

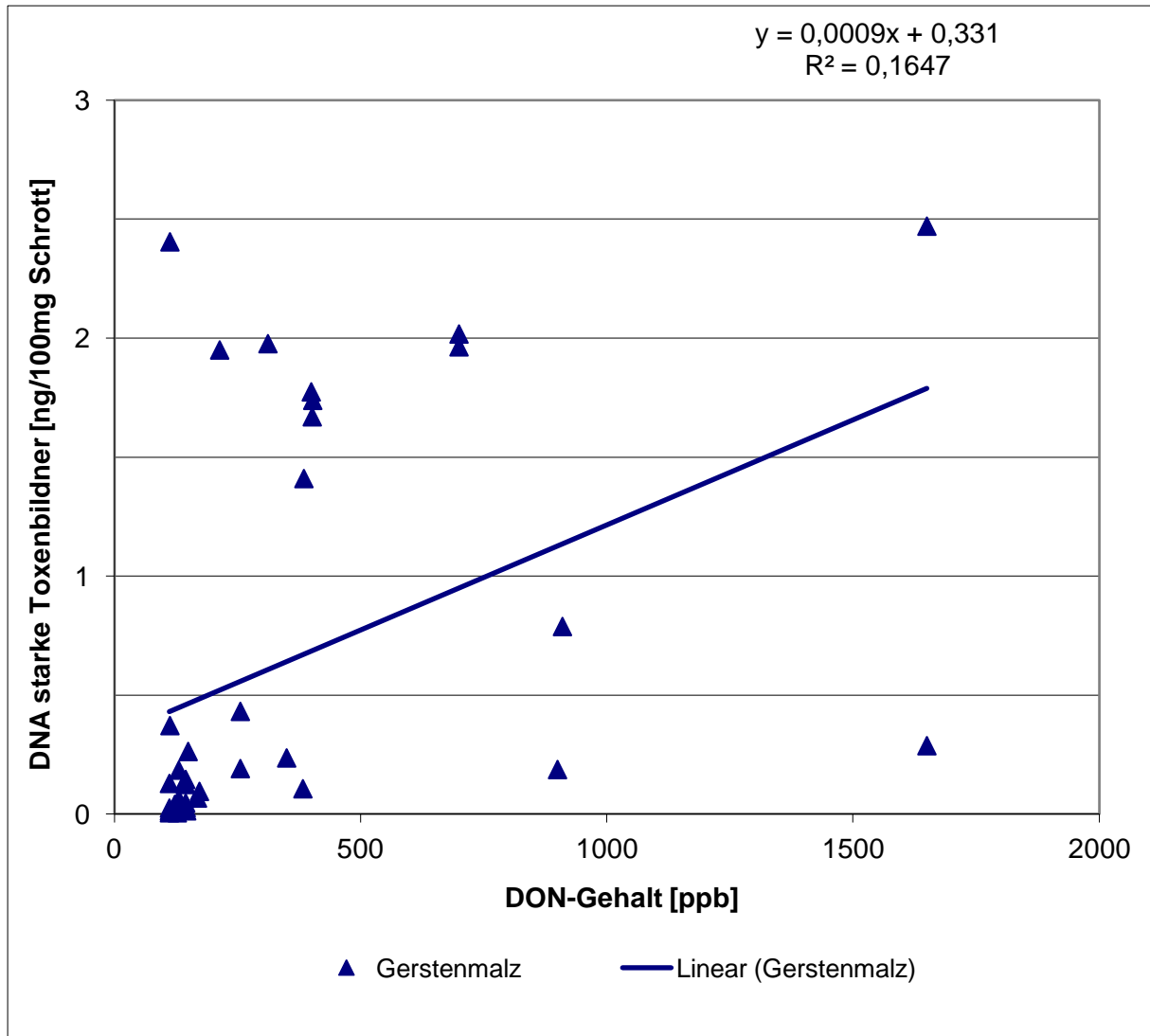


Abbildung 40: Isolierte DNA-Menge der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Gerstenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben

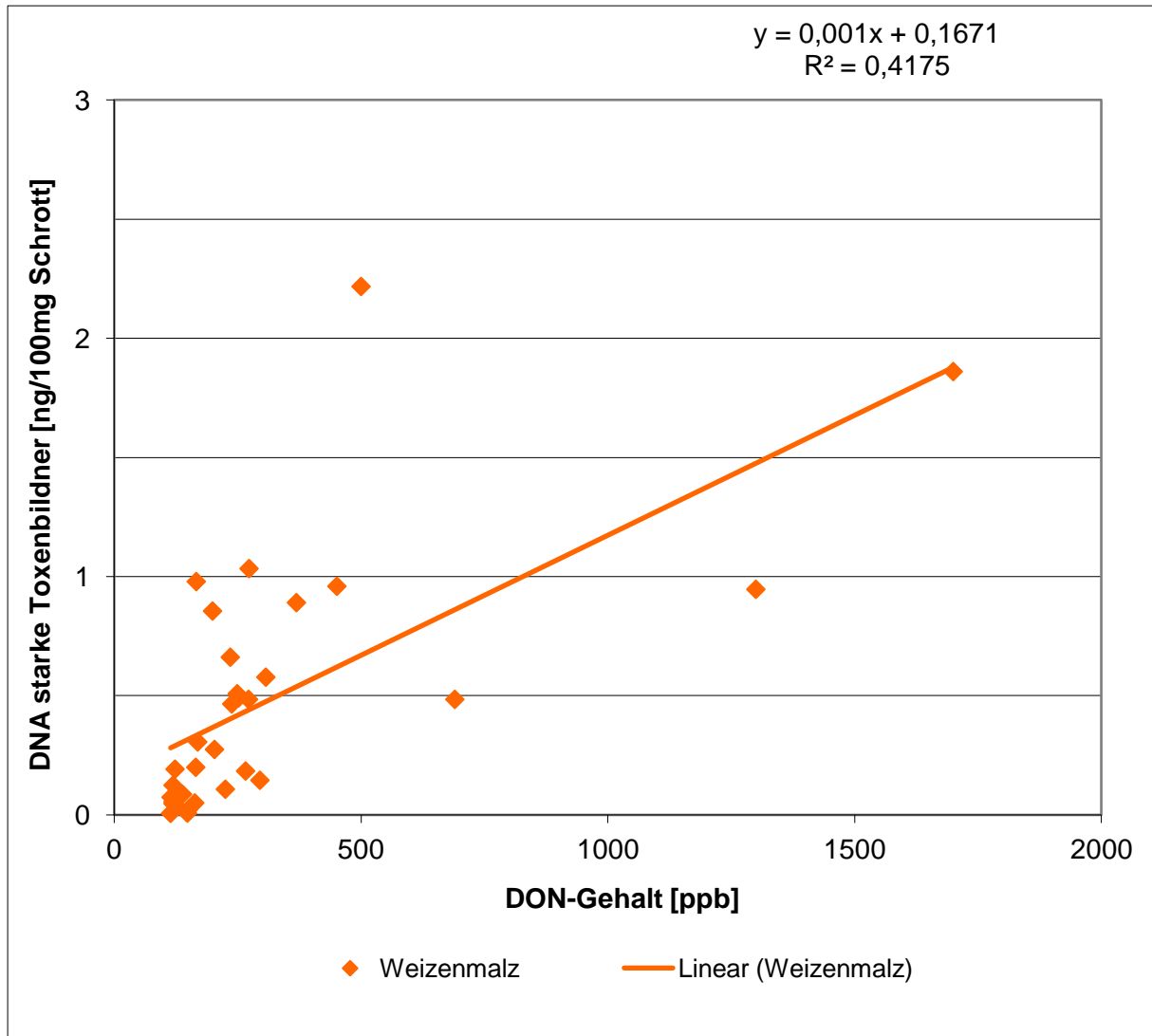


Abbildung 41: Isolierte DNA-Menge der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Weizenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben

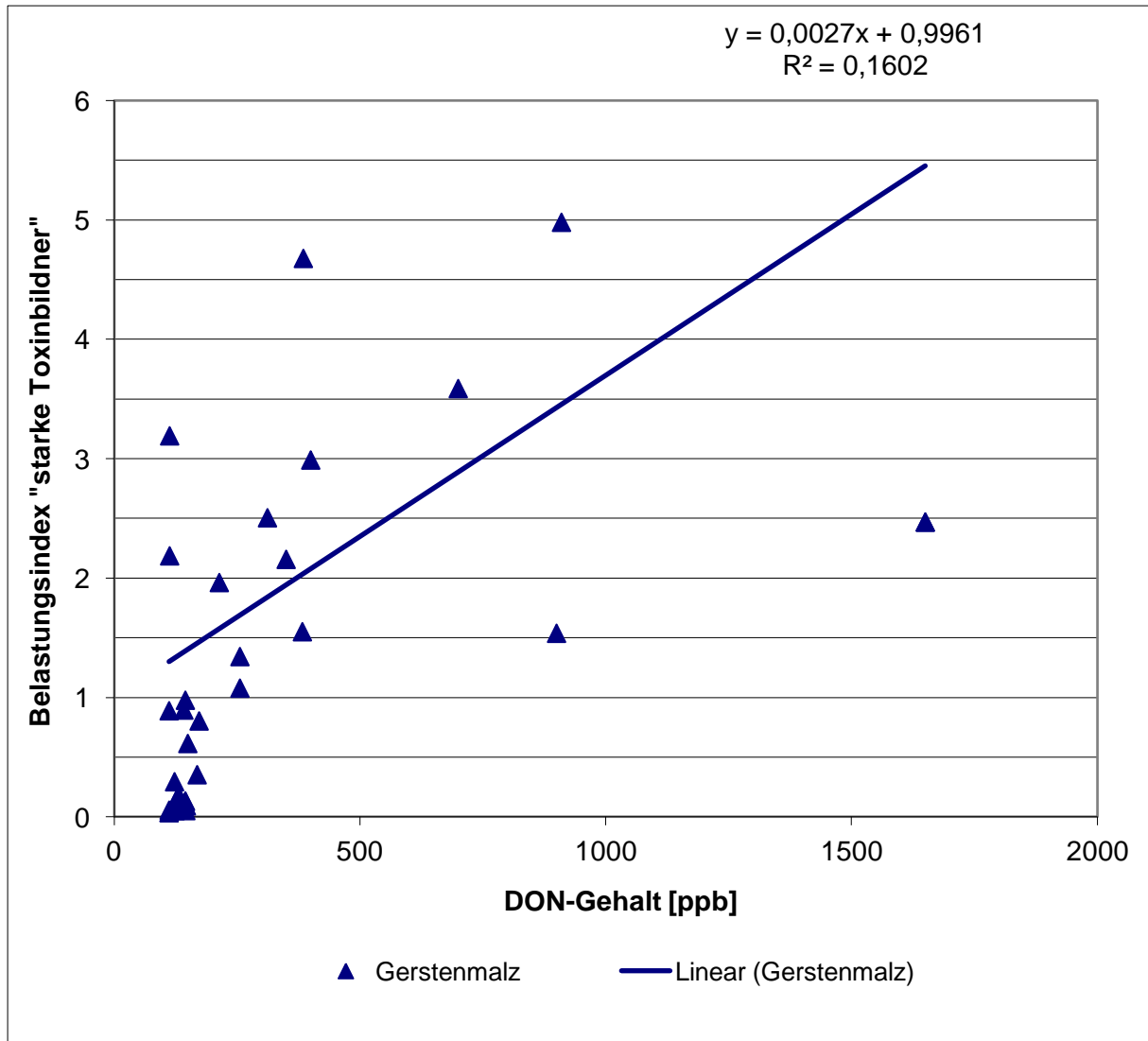


Abbildung 42: Belastungsindex der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Gerstenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben

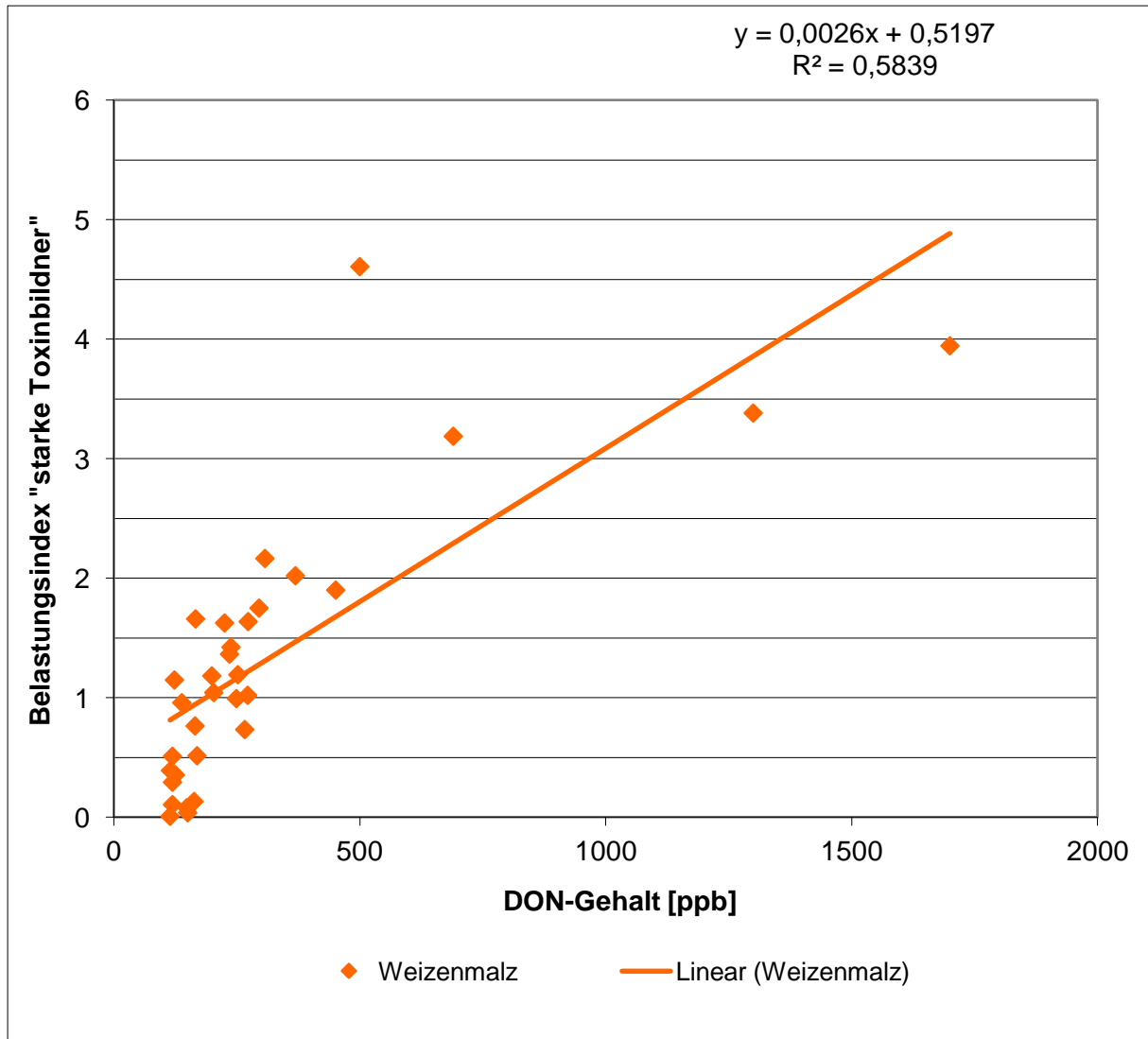


Abbildung 43: Belastungsindex der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Weizenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben

Aus Abbildung 40 bis Abbildung 43 wurde ersichtlich, dass zwischen den linearen Regressionskoeffizienten des DON-Gehalts und Belastungsindex bzw. isolierter DNA-Menge der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies bezogen auf Gersten- und Weizenmalzproben deutliche Unterschiede bestehen. Von der Bezugsgröße (Belastungsindex bzw. DNA-Menge) der Ordinate unabhängig, berechnete sich beim Gerstenmalz ein Bestimmtheitsmaß von jeweils bei  $R^2 \approx 0,16$  zwischen den stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies zum DON-Gehalt der Probe.

Im Gegensatz dazu variierte das Bestimmtheitsmaß im Fall der starken Toxinbildner zum DON-Gehalt bei Weizenmalzproben. Die DNA-Menge zeigte zum DON-Gehalt einen Wert von  $R^2 \approx 0,42$  während für den Belastungsindex im Vergleich zum DON-Gehalt ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \approx 0,58$  berechnet wurde. Mittels t-Test der Studentverteilung wurde der statistische Zusammenhang zwischen Belastungsindex und DON-Gehalt der Probe separat für Gersten- und Weizenmalz geprüft. Die Stichhaltigkeit beider Verteilungen wurde auf  $\alpha = 0,001$  % geprüft. Für Gerstenmalz ergab sich mit  $n = 37$  Freiheitsgraden ein Wert von  $t_{37;0,999} \approx 2,58 < t_0 = 3,326$ . Damit bestand in diesem Fall kein hoch signifikanter Zusammenhang.

Bei Weizenmalzproben mit einem Freiheitsgrad von  $n = 32$ , berechnete sich der Wert  $t_{32;0,999} \approx 6,48 > t_0 = 3,365$ , somit konnte an dieser Stelle von einem hoch signifikanter Zusammenhang gesprochen werden.



---

## 7 Diskussion

### 7.1 Entwicklung und Optimierung neuer PCR-Systeme

#### 7.1.1 Aufbau der Real-Time Multiplex PCR-Systeme

##### 7.1.1.1 Detektion eines Referenzgens aus der zu untersuchenden Pflanze

Zur Quantifizierung von Schimmelpilzpathogenen an Saatgut und Braumalz wurden zwei unterschiedliche, der Fragestellung angepasste Real-Time Multiplex PCR-Systeme verwendet. Beide PCR Assays sind in ihrem Grundaufbau ähnlich. Zwei Nachweisreaktionen messen den Besatz mit Schimmelpilzen, während eine dritte Detektionsreaktion jeweils ein Referenzgen der zu untersuchenden Pflanze amplifiziert.

Anhand von Standardkurven konnte die ursprünglich in der Probe vorliegende DNA-Menge berechnet werden. Die DNA der untersuchten Pathogene konnte danach ins Verhältnis zur gleichzeitig extrahierten DNA-Menge der Pflanze gesetzt werden. Folglich wurden die Messwerte der Kontaminanten aller analysierten Proben auf den gleichen Bezugspunkt - die Pflanzen-DNA - normalisiert und somit vergleichbar. Im Folgenden wird beschrieben, aus welchem Grund diese Vorgehensweise gewählt wurde.

Sowohl bei Zuckerrübensaatgut als auch bei Braumalz handelt es sich um festes Probenmaterial. Grundsätzlich könnte hier die Untersuchung von Praxisproben auf das Vorliegen von pathogenen Kontaminanten auf zwei Arten erfolgen. Eine Möglichkeit bestünde darin, die Oberfläche einer definierten Anzahl von Samenknäueln oder Körnern abzuwaschen und die entstandene Suspension auf Anwesenheit der Schädlings-DNA zu analysieren. Nachteil dieser Methode wäre sicherlich, dass die Schimmelpilzflora unter der Oberfläche eines Knäuels bzw. Kornes so keine Berücksichtigung findet. Ebenso variiert der Samen- bzw. Korndurchmesser und damit zwangsläufig auch die Oberfläche. Bei gleichmäßigem Keimbesatz des Untersuchungsmaterials würde die Keimzahl, die von der Oberfläche abgewaschen wird, starken Schwankungen unterliegen.

Um die oben beschriebenen Nachteile zu vermeiden, wurde die zweite Möglichkeit gewählt, das gesamte Probenmaterial vor der DNA-Extraktion zu zerkleinern. Aus der geschroteten und homogenisierten Probe wurde wiederum nur ein Quantum zur weiteren Bearbeitung entnommen. Ein möglicher Fehler beim Einwiegen des

Probenmaterials könnte an dieser Stelle als potenzieller Nachteil gesehen werden, wo-bei dieser durch die entsprechende Verwendung von Analysewaagen minimiert würde.

Zudem ist das DNA-Nachweissystem so aufgebaut, dass neben den beiden Pathogenen auch die Menge an Pflanzen-DNA im Untersuchungsmaterial gemessen wurde. Ausgehend von der Annahme, dass bei homogenem Material eine niedrigere Probeneinwaage bedeutet, dass auch eine geringere Menge an Pathogenen gemessen wird, kann die Belastung der Schimmelpilze jeweils in Relation zur isolierten Menge an Pflanzen-DNA analysiert werden.

Weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise der Detektion des Pflanzengens war die Nutzung dieser Reaktion als eine interne positive Kontrolle. Der Nachweis des Pflanzengens musste aus jeder extrahierten Probe erfolgen. Bei negativem Signal war die DNA-Isolierung oder die PCR-Reaktion nicht erfolgreich verlaufen, d.h. entweder war die PCR-Reaktion gehemmt oder es lag ein Fehler bei der DNA-Isolierung oder in der Zusammenstellung des Reaktionsansatzes vor.

#### 7.1.1.2 Nachweis von *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* an Zuckerrübensaatgut

Durch Verwendung dieses Systems konnte mittels einer kombinierten Nachweisreaktion der Besatz von Zuckerrübensaatgut mit *Alternaria* Spezies und *Phoma betae* differenziert werden. Zu Beginn der Arbeiten war geplant, aus der Gattung *Alternaria* die Spezies *Alternaria alternata* selektiv nachzuweisen. Aufgrund der sequenzspezifischen Gegebenheiten in der rDNA-Region des Keims war dies jedoch nicht möglich. Eng mit *Alternaria alternata* verwandte Spezies, wie beispielsweise *Alternaria tenuissima*, weisen eine nahezu identische Basenabfolge in diesem Bereich auf. Nach eingehender Analyse anderer Sequenzbereiche wurde festgestellt, dass ein stabiles PCR-System nur unter Einbeziehung weiterer *Alternaria* Spezies möglich war. Demnach ergaben sich zwei Möglichkeiten für die weitere Entwicklung. Entweder musste ein konservierter Bereich eines *Alternaria alternata* spezifischen Gens zur Amplifikation ausgewählt werden oder ein für ausgewählte *Alternaria* Spezies spezifisches Screening System entwickelt werden, basierend auf dem Nachweis eines rDNA-Sequenzbereichs. Aus mehreren Gründen wurde die zweite Möglichkeit gewählt.

Für den Bereich der rDNA-Region stehen sehr viele Vergleichsdaten anderer Keime zur *in silico* Validierung des PCR-Systems bezüglich der Spezifität von Primer und Sonde zur Verfügung, so dass Kreuzreaktionen mit anderen Keimen bereits bei der theoretischen Betrachtung ausgeschlossen werden konnten. Dies war bei den meisten regulatorischen Genen nicht der Fall. Ebenso wurde mit der Amplifikation eines rDNA-Abschnitts der Vorteil einer größeren Ausgangskopienzahl pro Zelle genutzt, welche die Nachweisgrenze positiv beeinflusste (vgl. 2.2.3.2). Zudem waren die verschiedenen Nachweissysteme zur Detektion beider Pathogene besser vergleichbar, wenn ein Abschnitt mit in etwa gleicher Ausgangskopienzahl amplifiziert wurde.

Neben den rein molekularbiologischen Gründen sprachen auch mikrobiologische Fakten für ein Screening System. Zum einem wurde damit unter anderem die bereits an Zuckerrüben nachgewiesene Spezies *Alternaria tenuissima* erfasst, zum anderen wurden auch Spezies wie *Alternaria mali*, die als Synonym für *Alternaria alternata* geführt werden, berücksichtigt (Standberg, 1992; Yu, 1992). Zum Teil wurden diese Spezies auch schon als Kontaminanten von Zuckerrüben nachgewiesen, so dass diese ebenfalls mit einem Screening Test auf Pathogene erfasst werden sollten, was diese Vorgehensweise aus mikrobiologischer Sicht rechtfertigte. Zudem ließ sich bei molekularbiologischer Betrachtung des Problems feststellen, dass über den Nachweis dieser Gruppe von *Alternaria* Spezies die größtmögliche Spezifität des PCR-Systems erreicht wird.

Von *Phoma betae* wurden im Rahmen dieser Arbeit Teile des Genoms sequenziert, da keine öffentlich zugänglichen Sequenzdaten zur Verfügung standen. Beim Vergleich der sequenzierten rDNA-Region mit anderen Schimmelpilzen wurde festgestellt, dass ein Teilstück prädestiniert für die Entwicklung der spezifischen Sonde erschien. Allerdings schränkte sich dadurch die Wahl des Vorwärtsprimers sehr stark ein. Diese Auswirkungen werden anschließend beim Vergleich der beiden entwickelten Real-Time Multiplex PCR Assays diskutiert.

Das gesamte entwickelte Real-Time Multiplex PCR-System erfasst hoch spezifisch die Zielorganismen und keine anderen Mikroorganismen, die als potenzielle Kontaminanten von Zuckerrüben bzw. Zuckerrübensaatgut auftreten.

### 7.1.1.3 Nachweis und Differenzierung von *Fusarium* Spezies an Braumalz

Für den Nachweis von *Fusarium* Spezies an Getreide bzw. daraus hergestellten Malzen existieren, wie eingangs beschrieben, schon mehrere Real-Time PCR Assays. Der an dieser Stelle verwendete Real-Time Multiplex PCR Assay unterscheidet sich zum Teil von den bisher veröffentlichten durch seinen modularen Aufbau und die Auswahl des zur Detektion verwendeten Genabschnitts. Teilbereiche der rDNA-Region verschiedener *Fusarium* Spezies eignen sich zum gruppenspezifischen Screening und wurden in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Bluhm, 2003).

Mit einem Screening wurden alle für Cerealienkontaminationen relevanten *Fusarium* Spezies erfasst. Parallel dazu wurden mit einer zweiten Reaktion aus dieser Gesamtheit die Gruppe der als stark toxinbildend beschriebenen Spezies (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* und *Fusarium cerealis*) separat erfasst. Um die Messwerte miteinander vergleichen zu können, sind beide PCR-Systeme auf demselben Genabschnitt lokalisiert. Nur so ist gewährleistet, dass die Ausgangskopienzahl der zur Amplifikation zu Verfügung stehenden DNA-Moleküle identisch ist. Des Weiteren ließ sich über die Differenz zwischen dem Gesamtbesatz der *Fusarium* Spezies und der Gruppe der starken Toxinbildner der Anteil der anderen *Fusarium* Spezies bestimmen. Nicht erfasst werden mit dem entwickelten Screening System Arten des *Fusarium solani* Komplexes, welche allerdings als Kontaminanten von Cerealien lediglich eine untergeordnete Rolle spielen (Bottalico, 1998; Zhang *et al.*, 2006).

### 7.1.2 Vergleich der beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme

Im Folgenden werden die beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme anhand der ermittelten und in Tabelle 39 aufgeführten molekularbiologischen und mathematischen Parameter verglichen.

Tabelle 39: Vergleich der beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut und zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von *Fusarium* Spezies

| Fluoreszenzmarkierung Detektionssonde | System 1:<br>Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut |                                     |   |                               |                             | System 2:<br>Nachweis und Differenzierung von <i>Fusarium</i> Spezies an Malz |                                     |   |                               |                             |
|---------------------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
|                                       | Nachweis-system  | Nachweis-grenze [GÄ pro PCR Ansatz] | Korrelations-koeffizient R <sup>2</sup> der Standardkurve | Effizienz des PCR-Systems [%] | Länge des PCR-Produkts [bp] | Nachweis-system   | Nachweis-grenze [GÄ pro PCR Ansatz] | Korrelations-koeffizient R <sup>2</sup> der Standardkurve | Effizienz des PCR-Systems [%] | Länge des PCR-Produkts [bp] |
| FAM                                   | Identifizierung <i>Phoma betae</i>                         | 4,5                                 | 0,9981  | 93,32                         | 126                         | Screening starke Toxinbildner   | 6,0                                 | 0,9992  | 98,52                         | 77                          |
| HEX                                   | Screening <i>Alternaria</i> Spezies                        | 4,5                                 | 0,9997  | 95,61                         | 135                         | Screening <i>Fusarium</i> Spezies   | 6,0                                 | 0,9997  | 96,32                         | 70                          |
| BODIPY TMR                            | Referenzgen Zuckerrübe                                     |                                     | 0,9988  | 91,41                         | 118                         | Referenzgen Gerste   Weizen   |                                     | 0,9977  | 97,00                         | 71                          |

Die Nachweisgrenzen der beiden Real-Time Multiplex PCR Assays waren mit 4,5 Genomäquivalenten (GÄ) für System 1 und 6 GÄ für System 2 in etwa gleich. Dies entsprach einer Menge von etwa 0,5 pg genomischer DNA je PCR-Ansatz.

Das Detektionssystem 1 wies für alle drei gemessenen Standardkurven ein Bestimmtheitsmaß von über 99,8 % auf, womit eine sehr gute Korrelation zwischen eingesetzter DNA-Menge und dem Ct-Wert vorlag. Bei System 2 wurde sowohl in Bezug auf den Nachweis der *Fusarium* Spezies als auch auf den Nachweis der Gruppe der stark toxinbildenden Spezies mit 99,92 % und 99,97 % ein nahezu optimaler Wert erreicht. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß zwischen eingesetzter Gersten bzw. Weizen-DNA und gemessenem Ct-Wert lag bei 99,77 % und war damit als ebenfalls sehr gut zu beurteilen. Ähnliche Werte wurden auch von anderen Autoren bei vergleichbaren Real-Time Multiplex PCR-Anwendungen unter Einsatz von TaqMan™-Sonden erzielt (Woron *et al.*, 2006).

Größere Unterschiede zwischen beiden Systemen bestanden hinsichtlich der PCR-Effizienz. Für den Nachweis der *Alternaria* Spezies wurden Werte von 93,3 %, für *Phoma betae* 95,6 % hinsichtlich der Effizienz ermittelt. Beide lagen damit in einem durchaus akzeptablen Bereich. Limitiert wurden die beiden Werte jedoch wahrscheinlich durch die Auswahl des Vorwärtsprimers der beiden Einzelsysteme. Sowohl Alt\_fp\_V1 als auch Pho\_fp\_V1 haben mit 38,5 % einen sehr niedrigen G/C-Gehalt (vgl. Tabelle 7 und Tabelle 8).

Um eine ausgewogene Annealingtemperatur aller Primer im Gesamtsystem zu gewährleisten, mussten mit jeweils 26 Basenpaaren relativ lange Oligonukleotide gewählt werden. Die beiden Primer anders zu positionieren, wäre aufgrund der jeweils hochspezifischen Detektionssonden nicht möglich gewesen, da deren Lage nicht geändert werden konnte.

Für die Detektion des Referenzgens aus der Zuckerrübe wurde eine Effizienz von 91,4 % ermittelt. Da dieses System von einem Projektpartner in bereits evaluierter Form zur Verfügung gestellt wurde, sollte dessen Integration in das Multiplex Real-Time PCR-System ohne Veränderungen vorgenommen werden. Eine mögliche Ursache für die etwas geringe Effizienz ist die um 3°C niedrigere Annealingtemperatur der Sonde dieses Systems im Vergleich zu den beiden anderen Einzelsystemen. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass die Sonde mit dem Farbstoff BODIPY-TMR markiert war, welcher auf der hier verwendeten Messplattform nicht optimal angeregt wird.

Bei den Real-Time Multiplex PCR-Messungen zur Bestimmung und Differenzierung des Besatzes von *Fusarium* Spezies an Braumalz bzw. Getreide wurden im Vergleich mit System 1 durchweg eine höhere PCR-Effizienz ermittelt. Für den Screening-Nachweis der *Fusarium* Spezies lag die Effizienz bei 98,5 %. Daneben wurde die Gruppe der starken Toxinbildner mit einer Effizienz von 96,3 % amplifiziert, die Detektion des Referenzgens aus Gerste und Weizen erfolgte mit einer Effizienz von 97,0 %. Alle Werte lagen somit in einem sehr engen Bereich.

Die Ursachen für die Unterschiede zwischen beiden Multiplex Real-Time PCR Assays war mit großer Wahrscheinlichkeit darin zu suchen, dass die Amplifikationsprodukte mit einer durchschnittlichen Länge von 73 Basenpaaren zum Nachweis und zur Gruppierung von *Fusarium* Spezies an Gerste und Weizen nochmals deutlich kürzer waren als die des Assays zum Nachweis der beiden Pathogene an Zuckerrübensaatgut mit einer durchschnittlichen Länge von 126 Basenpaaren.

### 7.1.3 Optimierung der Real-Time Multiplex PCR-Systeme

Die Optimierung der Real-Time Multiplex PCR-Systeme richtete sich zunächst auf die Entwicklung eines selbst hergestellten Master-Mixes. Anhand der durchgeführten Versuche wurde allerdings festgestellt, dass ein kommerzieller Mix in diesem Fall die bessere PCR-Performance bot und damit stabilere Rahmenbedingungen für die Quantifizierung von Praxisproben lieferte.

Auch wenn die Verwendung dieses Master-Mixes zunächst augenscheinlich höhere Kosten verursacht, konnte somit die material- und zeitintensive Optimierung der Primer- und Sondenkonzentrationen entfallen. Eine Substitution durch eine kostengünstigere Alternative des im hohen Preisniveau angesiedelten Qiagen Multiplex Master-Mixes, der für diese Studien verwendet wurde, war nicht zu empfehlen, wie eigene Versuche belegten.

Weiteres Potential die Performance entscheidend zu verbessern, wurde in der Verwendung einer anderen Messplattform gesehen. Nach den durchgeführten Tests ließ sich vermuten, dass ein Gerät mit einem breiteren Anregungsspektrum zu einer verbesserten Detektion der einzelnen Fluorophore führt. Damit würden die Unterschiede bezüglich der Fluoreszenzausbeute zwischen den einzelnen Fluorophoren nicht so gravierend ausfallen und damit die gleichzeitige Auswertung mehrerer Targets deutlich erleichtert werden. Ein zweiter Real-Time PCR Thermocycler konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr getestet werden.

## 7.2 Entwicklung und Optimierung der DNA-Isolierung

Zielsetzung dieses Abschnitts war, eine zur gewählten Referenzmethode von Macherey-Nagel in Bezug auf DNA-Ausbeute und PCR-Performance gleichwertige oder bessere DNA Isolierungsmethode zu entwickeln. Dies konnte sowohl für die DNA- Extraktion der Pathogene von Zuckerrübensaatgut als auch für die *Fusarium* Spezies von Gerste und Weizen erreicht werden.

Die Aufgabenstellung war im Wesentlichen durch zwei Faktoren determiniert. Zum einen waren dies die Organismen selbst, deren DNA detektiert werden sollte, zum anderen spielte die Probenmatrix Saatgut bzw. Malz eine entscheidende Rolle. Demnach musste sichergestellt werden, dass sowohl aus den Schimmelpilzen als auch aus den untersuchten Körnern DNA in einer ausreichenden Menge und Qualität isoliert werden konnte.

Schimmelpilze erweisen sich als sehr rigide gegenüber verschiedenen Methoden der Zellyse. Ursächlich dafür ist der Aufbau der Zellwand der hier untersuchten Ascomyceten. Diese besteht aus Chitin, das heißt  $\beta$ -1,4-Poly- N-Acetyl- D-Glucosamin,  $\alpha$ (1-3)-Glucan und Galaktomannoproteinen, die kovalent miteinander quervernetzt sind und dadurch eine hohe chemisch-physikalische Stabilität aufweisen (Walker und White, 2005). Außerdem kam hinzu, dass es sich bei den untersuchten Probenmaterialien um verschiedene Samenkörner (Getreidekörner sowie Zuckerrübenknäule) handelte. Damit bestand die Probenmatrix neben pflanzlicher und pilzlicher DNA zu großen Teilen aus Polysacchariden, Proteinen und Polyphenolen. Seit langem ist bekannt, dass sich diese Inhaltsstoffe je nach Konzentration inhibierend auf die anschließende PCR auswirken können (Demeke und Adams, 1992). Folglich mussten diese Stoffe möglichst quantitativ aus der Probe entfernt werden, um hochreine DNA für die PCR-Amplifikation zu erhalten.

Zur Isolierung der DNA aus Pflanzen sowie aus Schimmelpilzen wurde noch bis vor wenigen Jahren hauptsächlich eine sich an die Extraktion anschließende Phenol/Chloroform Aufreinigung durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sich hydrophobe Lipide in der organischen Phase, Proteine in der Interphase des Proben - Phenol/Chloroform Gemischs sammeln. Die DNA bleibt hingegen aufgrund der polaren Gruppen ihres Zuckerphosphat-Rückgrats in der wässrigen Phase gelöst. So lassen sich inhibierende Substanzen über die organische Phase aus der Probe entfernen. Im Vergleich zur Aufreinigung der DNA über Silika-Membranen ist diese Art der Extraktion kostengünstiger. Zudem unterliegt sie im Gegensatz zur Silika-Membran keinen Restriktionen hinsichtlich der Bindekapazität. Somit können größere DNA-Mengen isoliert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass in einem normal ausgestatteten molekularbiologischen Labor alle zur Durchführung der Phenol-Methode notwendigen Reagenzien vorhanden sind. Gravierender Nachteil ist der Umgang mit gesundheitsgefährdenden Substanzen sowie die Entsorgung des giftigen Phenol/Chloroform Sondermülls. Die an dieser Stelle entwickelte Methode sollte im Gegensatz dazu später auch im Brauerei- bzw. Mälzereilabor problemlos angewandt werden können. Zum einen wurde aus Gründen der Entsorgungsproblematik eine Phenol/Chloroformaufreinigung nicht näher in Betracht gezogen. Zum anderen waren die zum Teil sehr zeitaufwendigen Isolierungsvorschriften nicht für den Routineablauf im Labor zu empfehlen. Darüber hinaus benötigt das Personal zumindest einige Grundlagenkenntnisse im Bereich der Molekularbiologie.



Folglich fokussierte sich die Entwicklungstätigkeit auf die Extraktion und Aufreinigung über eine Silika-Matrix. Mittlerweile haben sich mehrere Anbieter von Spin-Säulchen am Markt etabliert, so dass eine Produktauswahl und Differenzierung hinsichtlich Beschaffenheit, Materialqualität, funktionalen Eigenschaften und Preis möglich war.

Im Mittelpunkt der durchgeführten Versuche stand zunächst die Entwicklung eines Extraktionspuffers, der in Kombination mit einem ebenfalls selbst hergestellten Bindepuffer ein zur Referenzmethode von Macherey-Nagel mindestens gleich gutes Ergebnis in Bezug auf die DNA-Ausbeute und PCR-Performance liefern sollte. Basis der Versuche bildeten acht verschiedene Extraktionspuffer, welche neben dem Hauptbestandteil Wasser auch Tris-HCl sowie unterschiedliche Anteile sowohl anionischer, beispielsweise SDS oder Sarcosyl, als auch nicht ionischer Detergenzien wie Tween 20, CTAB oder aber Triton-X 100 enthielten. Zum Teil wurden Detergenzien auch in Kombination eingesetzt, wobei im vorliegenden Fall die besten Resultate mit den Extraktionspuffern erzielt wurden, die entweder nur eine anionische oder aber eine nicht ionische Komponente enthielten. Allerdings galt es bei der Bewertung der Ergebnisse zu beachten, dass alle Aufschlussreaktionen nach demselben Zeit- und Temperaturprotokoll durchgeführt wurden und dieses nicht zwangsläufig für alle Extraktionspuffer optimal sein muss. An dieser Stelle wurden jedoch keine Variationen desselbigen vorgenommen, da nach Auswahl des zum Extraktionspuffer passenden Bindepuffers bereits eine der Zielsetzung entsprechende Lösung der Aufgabenstellung gefunden werden konnte. Bezüglich des Bindepuffers ist noch anzumerken, dass für die optimale Bindung der DNA an die Silika-Membran der pH-Wert von entscheidender Bedeutung war. Vorteilhaft wurde in diesem Zusammenhang die Pufferung mit Tris-HCl im Gegensatz zu MOPS festgestellt.

Weitere Anstrengungen zur Optimierung des DNA-Isolierungsprotokolls wurden nicht vorgenommen, da die Ergebnisse insgesamt sowohl für die Extraktion der DNA von Pflanzen als auch der pathogenen Schimmelpilze vergleichbar zur Referenzmethode waren. Möglicherweise lässt sich das Verfahren noch in Hinblick auf die Aspekte Zeit oder Ausbeute verfeinern. So wäre beispielsweise denkbar, eine zusätzliche Proteinase K Behandlung in das Extraktionsprozedere zu integrieren. Vermutlich könnte dadurch die DNA-Ausbeute und Reinheit gesteigert werden, dies würde jedoch zwangsläufig auch mit einer Kostensteigerung sowie einem höheren Zeitaufwand verbunden sein.

Daneben wäre auch denkbar, die Inkubationszeit der Probe im Extraktionspuffer, dem mit 30 Minuten zeitintensivsten Bearbeitungsschritt, zu verkürzen. In diesem Fall müsste jedoch mit geringeren DNA-Ausbeuten gerechnet werden.

### 7.3 Analyse von Gersten- und Weizenmalzproben

Die Überlegung, DNA aus Getreide- und Malzproben mittels PCR-Analyse zu untersuchen, um eine mögliche Kontamination von Mikroorganismen festzustellen oder besser noch gleichzeitig deren Grad quantifizieren zu können, entstand schon vor mehr als 10 Jahren (Parry und Nicholson, 1996; Nicholson *et al.*, 1998). Aufgrund verfeinerter Messtechnik, einer größeren Auswahl verschiedener Fluorophore sowie kontinuierlicher Optimierung von Reaktionsmastermixen ging die Entwicklung auf diesem Gebiet von der Endprodukt-PCR inzwischen hin zu Real-Time Multiplex PCR Assays. Vorteile sind neben der Echtzeitanalyse vor allem im Erhalt mehrerer Informationen durch lediglich einen Reaktionsansatz zu sehen. Die molekularbiologischen Daten einer Probe werden im Anschluss oftmals mit Mykotoxinuntersuchungen, phytopathologischen Phänomenen oder mikrobiologischen Analysen in Zusammenhang gebracht. Darauf basierend wurden zwei Ziele zu Beginn der Messreihen mit Praxisproben formuliert. Einerseits sollte untersucht werden, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Belastung an *Fusarium* Spezies und dem Gushingverhalten des Malzes besteht. Andererseits galt es daneben zu analysieren, ob über die jeweils gruppenspezifischen Nachweise von *Fusarium*-DNA Rückschlüsse auf das Leittoxin DON möglich sind.

Insgesamt wurden 273 Praxisproben sowie ca. 600 Proben in den Vorversuchen untersucht. Aus allen Proben wurde mit der selbst entwickelten Isolierungsmethode DNA extrahiert und mittels Multiplex Real-Time PCR-Reaktionen analysiert. Eine Inhibition der PCR-Reaktion trat in keinem Fall auf. Dies konnte als ein Indiz für die Zuverlässigkeit der DNA-Extraktionsmethode sowie die Stabilität des Multiplex Real-Time PCR-Mixes gewertet werden.

Zunächst wird das Gushingverhalten diskutiert, wobei beim Weizenmalz keine positiven Befunde nach ELISA Test festgestellt wurden. Hingegen lag bei 14 von insgesamt 172 Gerstenmalzproben positives Gushingverhalten vor. Von diesen Proben wurden vier der Kategorie 3 (DON < 111 ppb; Gushing positiv) zugeordnet. Bei allen lag der Belastungsindex der stark toxinbildenden Gruppe immer deutlich unter dem im Ergebnisteil festgelegten kritischen Wert von 1.

Daneben fielen zehn Proben in die Kategorie 4 (DON > 111 ppb; Gushing positiv). Diese zeigten nahezu alle einen erhöhten Belastungsindex in Bezug auf die Gruppe der starken Toxinbildner, nur bei einer Probe lag der Wert unter 1. Zudem wurden für die Gesamtbelastung an *Fusarium* Spezies in dieser Kategorie die höchsten Werte ermittelt (vgl. Abbildung 39). Ähnliche Muster konnten allerdings auch in Kategorie 2 der Gerstenmalzproben wiedergefunden werden (vgl. Abbildung 38), die zwar durch nachweisbare DON-Werte, gleichzeitig aber durch negatives Gushingverhalten charakterisiert war. Selbst in Kategorie 1, also Proben ohne nachweisbares Gushingverhalten und messbaren DON-Gehalt, traten Gerstenmalzproben mit einem sehr hohen Gesamtbelastungsindex auf (vgl. Abbildung 33, Probe 1090 sowie Abbildung 35, Probe 1075). Demnach konnte weder die Gesamtbelastung noch die Kontamination des Malzes mit den starken Toxinbildnern in einem direkten kausalen Zusammenhang mit dem Auftreten des Gushingphänomens gesehen werden.

Dies ist ein weiteres Anzeichen dafür, dass nicht allein das bloße Vorhandensein von *Fusarium* Spezies das primäre Gushingrisiko erhöht (Gastl *et al.*, 2008). Vielmehr müssen auch bestimmte Umweltfaktoren erfüllt sein, welche gewisse physiologische Reaktionen des Schimmelpilzes bedingen. Wie auch andere Arbeiten in diesem Forschungsfeld zeigten, kann nicht von dem Auslöser an sich gesprochen werden, sondern vielmehr handelt es sich um eine Kombination verschiedener Faktoren. So kann nicht nur die Anwesenheit bestimmter pilzlicher hydrophober Proteine, sondern auch die Abwesenheit von Stabilisatoren als ursächlich angesehen werden (Hippeli und Elstner, 2002; Sarlin *et al.*, 2005b; Zapf, 2006). Daneben wird der Eintrag von hitzestabilen Proteasen als ein möglicher Gushingauslöser gesehen. Über die Degradation glycosylierter Proteine während des Brauprozesses entstehen extrem oberflächenaktive Peptide, die als Kondensationskeime ein Überschäumen des Bieres auslösen können (Hippeli und Elstner, 2008).

In Bezug auf die DON-Belastung einer Probe und die Kontamination mit *Fusarium* Spezies der stark toxinbildenden Gruppe ließen sich jedoch gewisse Zusammenhänge beobachten. So wurde nach Auswertung der Messreihen festgestellt, dass ein Belastungsindex dieser Gruppe von  $\geq 1$  fast immer mit erhöhten DON-Werten von > 175 ppb einherging. Auf Grundlage dieser Betrachtungsweise wurden von den 172 untersuchten Gerstenmalzproben nur zwei falsch negativ bewertet. Bei den 101 analysierten Weizenmalzproben ergaben sich eine falsch positive sowie zwei falsch

negative Aussagen. Ein direkter linearer Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt einer Probe und dem Belastungsindex der starken Toxinbildner bzw. der isolierten DNA-Menge der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies konnte indes für Gerstenmalz nicht festgestellt werden ( $R^2 = 0,16$ ). Hingegen wurde beim Weizenmalz ein Zusammenhang zwischen dem DON-Gehalt und dem Belastungsindex der starken Toxinbildner beobachtet ( $R^2 = 0,58$ ). Für die isolierte DNA-Menge der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies war dieser Zusammenhang schwächer ausgeprägt ( $R^2 = 0,42$ ).

Verschiedene Gründe sind an dieser Stelle zu diskutieren. Das Leittoxin DON gehört zur Gruppe der Trichothecene des Typs B, daneben werden noch die Typen A, C und D unterschieden. Innerhalb der Gruppe des Typs B existieren wiederum verschiedene toxische Verbindungen, zu deren wichtigsten Vertretern neben Deoxynivalenol (DON) auch 3-Acetyl-Deoxynivalenol (3-AcDON), 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-AcDON) und Nivalenol (NIV) zählen (Offenbächer, 2001). Wie in Abschnitt 2.2.5 dargestellt, waren die molekularbiologischen Voraussetzungen derart, dass die Real-Time PCR-Reaktion zur Detektion der stark toxinbildenden *Fusarium* Spezies die Arten *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. cerealis* erfasst. Alle drei Spezies bilden Trichothecene vom Typ B, wobei *F. cerealis* laut verschiedener Studien NIV, aber kein DON bildet (Sugiura *et al.*, 1993; Chandler *et al.*, 2003). Denkbar wäre, dass ein stark mit *F. cerealis* belastetes Getreide einen hohen Belastungsindex annimmt, wobei gleichzeitig ein niedriger DON-Gehalt vorliegt.

Dass dies aber nicht der einzige Grund für die Abweichung im Zusammenhang zwischen Belastungsindex der starken Toxinbildner und DON-Gehalt einer Probe sein konnte, zeigten Arbeiten anderer Autoren. Eine finnische Forschergruppe um Sarlin nutzte zur Analyse zwei Real-Time PCR Assays, den ersten zum generellen Screening für trichothecen-bildende *Fusarium* Spezies und einen zweiten zum spezifischen Nachweis von *F. graminearum*. Geprüft wurden neben mit *Fusarium* Spezies inokulierten Gersten auch natürlich infizierte Proben aus Nordamerika und Finnland. Für die Muster aus Übersee konnte mit beiden Real-Time PCR Assays eine gute Korrelation zwischen DNA-Menge und DON-Gehalt festgestellt werden ( $R^2$  jeweils  $> 0,9$ ). Dieses Probenmaterial war im Gegensatz zu dem finnischen deutlich höher kontaminiert.

Nach Auswertung der Messresultate wurde für den Real-Time PCR Screening Assay bezüglich der finnischen Gerstenrohfrucht und Gerstenmalzproben eine Korrelation von  $R^2 = 0,242$  festgestellt, mit dem spezifischen Assay lag dieser Wert bei  $R^2 = 0,171$  (Sarlin *et al.*, 2006) Ergänzend zu diesen Resultaten berichtet die Veröffentlichung einer tschechischen Arbeitsgruppe, dass ein hoher DON-Gehalt einer Probe sehr gut mit der DNA-Menge eines Kontaminanten korreliert. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass lediglich künstlich mit *F. culmorum* infizierte Gersten- und Weizenproben untersucht wurden (Leiřová *et al.*, 2006).

Dass in beiden Fällen bei künstlich kontaminiertem Getreide eine hohe Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt von *Fusarium* Spezies und DON-Gehalt beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auch in hohem Maße durch den zur Inokulation verwendeten *Fusarium* Stamm bedingt. So lassen sich verschiedene *F. culmorum* und *F. graminearum* Arten in Chemotyp I bzw. II einteilen. Typ I ist dadurch gekennzeichnet, dass eine große Menge an DON, dafür aber weniger NIV gebildet wird. Bei Typ II verhält sich dieser Sachverhalt genau umgekehrt (Bakan *et al.*, 2002; Chelkowski, 1998). Für die natürlich infizierten und analysierten Malzproben in dieser Arbeit wurde keine weitere Differenzierung, beispielsweise über eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese der PCR-Produkte in DON bzw. NIV Chemotyp vorgenommen (Li *et al.*, 2005). Interessant wäre diese Untersuchung bei Proben, die bei vergleichsweise niedrigem DON-Gehalt einen hohen Belastungsindex aufweisen. Zu nennen wären an dieser Stelle insbesondere die Gerstenmalzproben 80, 81, 136 (vgl. Abbildung 40).

Der umgekehrte Fall, eine falsch negative Aussage, das heißt der Belastungsindex zeigte einen zu niedrigen Wert im Vergleich zum DON-Gehalt, trat ebenfalls auf. Auch hier waren speziell zwei Gerstenmalzproben, 185 und 1049, (vgl. Abbildung 40) betroffen.

Zusammenfassend lassen sich drei Gründe als mögliche Ursachen für „falsch positive“ bzw. „falsch negative“ Bewertung einer Probe ableiten:

1. Das Getreide war hoch mit einem Stamm von *Fusarium cerealis* kontaminiert, der nicht in der Lage ist, DON zu bilden.
2. Die detektierten *Fusarium culmorum* bzw. *Fusarium graminearum* Stämme gehören dem Chemotyp II an und bilden nur wenig DON.

3. Aufgrund von speziellen Umweltbedingungen haben die in niedriger Menge am Korn vorhandenen *Fusarium culmorum* bzw. *Fusarium graminearum* Spezies hohe Mengen an DON produziert.

Eine exakte Korrelation zwischen dem Mykotoxingehalt einer Probe und der vorliegenden Menge an *Fusarium* in einer Probe wird es wahrscheinlich nicht geben können. Untersuchungen zeigten, dass der gleiche *Fusarium culmorum* Stamm, welcher dem Chemotyp II zugeordnet ist, unter bestimmten Bedingungen ebenfalls beträchtliche Mengen an DON produzieren kann (Birzele *et al.*, 2002; Mesterházy, 2002).

Bei Praxisproben ist immer zu beachten, dass die Witterungsbedingungen einen erheblichen Einfluss auf die Mykotoxinproduktion von Schimmelpilzen auf Getreide haben (Brennan *et al.*, 2005). In einer anderen Veröffentlichung konnte durch Schollenberger *et al.* (2002) gezeigt werden, dass Weizenmehl abhängig von der Anbaumethode mehr oder weniger DON enthält. Daneben ist auch die Vorfrucht von Bedeutung, beispielweise ist nach Maisanbau mit einer höheren *Fusarium* Belastung des Getreides zu rechnen (Ellner, 2001). Ebenfalls können die Lagerungsbedingungen den Mykotoxingehalt beeinflussen, so steigt der DON-Gehalt von schwach bis mäßig kontaminierten Proben bei feuchtwarmer Lagerung (Homdork *et al.*, 2000). Des Weiteren haben Untersuchungen gezeigt, dass zum Teil erhebliche regionale Unterschiede hinsichtlich des DON-Bildungspotentials bestehen (Tanaka *et al.*, 1988; Miedaner *et al.*, 2001).

Bei Getreide beeinflussen viele Faktoren in Kombination das Wachstum von Schimmelpilzen und die Mykotoxinbelastung einer Probe. Mit der hier entwickelten Methode ist es möglich, durch ein schnelles und gezieltes Screening besonders kritische Chargen frühzeitig zu identifizieren und diese vom weiteren Verarbeitungsprozess auszuschließen.

## 7.4 Ausblick

Beide in dieser Arbeit verwendeten Real-Time Multiplex PCR Assays zur molekularbiologischen Quantifizierung von Schimmelpilzbesatz an Saatgut und Braumalz sowie die dazugehörige DNA Isolierungsmethode haben ihre Praxistauglichkeit im Rahmen dieser Arbeit unter Beweis gestellt.

Insgesamt bedarf es noch weiterer Untersuchungen zur Bestätigung oder aber auch zur Ablehnung der in der Diskussion aufgestellten Thesen hinsichtlich des *Fusarium* Besatzes an Malzproben und dem DON-Gehalt einer Probe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben aus dem Jahr 2006 betrachtet, um zunächst zu klären, ob und in welchem Umfang sich die hier entwickelte Analysenmethode zur Untersuchung von Getreide- und Malzproben eignet.

Möglicherweise ließen sich in einem breiter angelegten Forschungsvorhaben, welches die Interessensgruppen der Getreideanbauer, Mälzer und Brauer umfasst, umfangreichere Datenerhebungen durchführen. Neben Herkunftsregionen sollten auch die zugehörigen Witterungsbedingungen während Blüte und Abreife des Kornes erfasst werden. Daneben sind auch die Mälzungsparameter mit in die Betrachtung aufzunehmen.

Im Bereich der Rohstoffweiterverarbeitung bietet sich ebenfalls eine Anwendungsmöglichkeit des entwickelten Testverfahrens an, die in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnte. Unter Umständen könnte mittels des Multiplex Real-Time PCR Assays der Zeitpunkt des höchsten Infektionsdrucks von *Fusarium* Spezies während der Blüte des Getreides sicher bestimmt werden. Damit würden sich Pflanzenschutzmaßnahmen gezielt planen und einsetzen lassen.

Allgemein bestehen auf dem Gebiet der phytopathologischen Analyse mittels Real-Time Multiplex PCR vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Hemmnis für eine weitere Verbreitung der Technologie als Routineanalyse sind zurzeit noch die Preise für Analysegeräte und die Kosten für Reagenzien.

## 8 Anhang

(A) Messreihe des Real-Time Multiplex PCR-Systems zum Nachweis der Pathogene *Phoma betae* und *Alternaria* Spezies an Zuckerrübensaatgut

| Detektionssystem                             |       | Nachweis <i>Phoma betae</i> |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
|--|-------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|--|
| Effizienz [%]                                | 95,61 | Bestimmtheitsmaß $R^2$      |       |       |       |       |       |       |       | 0,9997                 |                   |  |
|  |       | Messreihe                   |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
| DNA <i>Phoma betae</i><br>[ng/µl PCR-Ansatz] | 1     | 2                           | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |  |
| 1,67   | 23,06 | 22,67                       | 22,39 | 21,64 | 22,84 | 21,35 | 23,97 | 23,66 | 23,08 | 22,74                  | 0,86              |  |
| 0,17   | 25,47 | 25,29                       | 25,64 | 25,15 | 25,23 | 26,05 | 26,98 | 27,27 | 27,63 | 26,08                  | 0,96              |  |
| 0,02   | 29,46 | 29,59                       | 29,10 | 29,02 | 28,90 | 28,90 | 30,46 | 31,00 | 31,09 | 29,72                  | 0,89              |  |
| 0,002  | 32,05 | 32,65                       | 32,12 | 32,83 | 32,77 | 32,42 | 34,22 | 33,34 | 33,84 | 32,92                  | 0,75              |  |
| 0,0002                                       | 38,35 | 35,29                       | 37,26 | 35,23 | 36,34 | 36,60 | 36,49 | 35,46 | 37,31 | 36,48                  | 1,05              |  |

| Detektionssystem                                      |       | Screening <i>Alternaria</i> Spezies |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
|---|-------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|--|
| Effizienz [%]   | 93,32 |                                     |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
|   |       | Messreihe                           |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
| DNA <i>Alternaria alternata</i><br>[ng/µl PCR-Ansatz] | 1     | 2                                   | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |  |
| 1,67  | 22,41 | 21,97                               | 21,78 | -3,00 | 23,00 | 22,40 | 21,85 | 21,39 | 22,25 | 19,34                  | 8,39              |  |
| 0,17  | 25,09 | 24,91                               | 25,59 | -3,00 | 26,24 | 26,01 | 25,38 | 25,37 | 25,06 | 22,29                  | 9,50              |  |
| 0,02  | 29,27 | 29,53                               | 29,29 | -3,00 | 29,55 | 29,13 | 29,27 | 29,59 | 30,11 | 25,86                  | 10,83             |  |
| 0,002   | 32,93 | 32,76                               | 32,50 | -3,50 | -3,50 | -3,50 | 32,43 | 32,99 | 33,35 | 20,72                  | 18,17             |  |
| 0,0002  | 36,17 | 36,32                               | 37,54 | 34,12 | 35,68 | 35,45 | 36,98 | 35,46 | 35,69 | 35,93                  | 0,98              |  |

| Detektionssystem                     |       | Nachweis Referenzgen Zuckerrübe |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
|--------------------------------------|-------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|--|
| Effizienz [%]                        | 91,41 |                                 |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
|                                      |       | Messreihe                       |       |       |       |       |       |       |       |                        |                   |  |
| DNA Zuckerrübe<br>[ng/µl PCR-Ansatz] | 1     | 2                               | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |  |
| 16,67                                | 25,19 | 25,01                           | 24,87 | 25,28 | 25,74 | 26,05 | 24,89 | 24,96 | 24,16 | 25,13                  | 0,54              |  |
| 1,67                                 | 28,48 | 28,20                           | 28,52 | 28,24 | 28,62 | 27,91 | 27,78 | 29,08 | 28,61 | 28,38                  | 0,40              |  |
| 0,17                                 | 31,90 | 32,69                           | 32,11 | 32,20 | 32,36 | 32,38 | 31,53 | 32,79 | 31,72 | 32,19                  | 0,42              |  |
| 0,017                                | 35,03 | 35,40                           | 35,43 | 35,40 | 35,38 | 35,25 | 34,98 | 35,74 | 35,76 | 35,37                  | 0,27              |  |
| 0,0017                               | 38,01 | 39,36                           | 38,88 | 39,86 | 38,12 | 39,63 | 39,67 | 40,47 | 40,28 | 39,36                  | 0,87              |  |



(B) Messreihe des Real-Time Multiplex PCR-Systems zur Screening Analyse und Differenzierung von *Fusarium* Spezies an Gerste- und Weizenproben

| <b>Detektionssystem</b>                               |  | <b>Screening <i>Fusarium</i> Spezies</b> |       |       |       |                        |                   |
|---|--|--|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|
| <b>Effizienz [%]</b>                                  |  | <b>98,52</b>                             |       |       |       |                        |                   |
|   |  | Messreihe                                |       |       |       |                        |                   |
| DNA <i>Fusarium graminearum</i><br>[ng/µl PCR-Ansatz] |  | 1  | 2     | 3     | 4     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |
| 2,50  |  | 20,76                                    | 19,78 | 20,62 | 20,97 | 20,53                  | 0,52              |
| 0,25  |  | 23,80                                    | 24,06 | 24,04 | 24,23 | 24,03                  | 0,18              |
| 0,03  |  | 27,55                                    | 27,60 | 27,69 | 27,45 | 27,57                  | 0,10              |
| 0,003   |  | 30,79                                    | 30,86 | 30,44 | 31,17 | 30,82                  | 0,30              |
| 0,0003  |  | 34,31                                    | 33,62 | 33,82 | 33,97 | 33,93                  | 0,29              |

| <b>Detektionssystem</b>                               |  | <b>Screening Gruppe starke Toxinbildner</b> |       |       |       |                        |                   |
|---|--|---|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|
| <b>Effizienz [%]</b>                                  |  | <b>96,32</b>                                |       |       |       |                        |                   |
|   |  | Messreihe                                   |       |       |       |                        |                   |
| DNA <i>Fusarium graminearum</i><br>[ng/µl PCR-Ansatz] |  | 1   | 2     | 3     | 4     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |
| 2,50  |  | 20,90                                       | 20,79 | 20,64 | 21,06 | 20,85                  | 0,18              |
| 0,25  |  | 24,35                                       | 24,69 | 24,29 | 24,76 | 24,52                  | 0,24              |
| 0,03  |  | 27,79                                       | 27,88 | 27,79 | 27,70 | 27,79                  | 0,07              |
| 0,003   |  | 30,92                                       | 31,54 | 31,23 | 30,84 | 31,13                  | 0,32              |
| 0,0003  |  | 34,81                                       | 34,49 | 34,99 | 34,15 | 34,61                  | 0,37              |

| <b>Detektionssystem</b>                   |  | <b>Nachweis Referenzgen Gerste   Weizen</b> |       |       |       |                        |                   |
|---|--|---|-------|-------|-------|------------------------|-------------------|
| <b>Effizienz [%]</b>                      |  | <b>97,00</b>                                |       |       |       |                        |                   |
|   |  | Messreihe                                   |       |       |       |                        |                   |
| DNA Gerste / Weizen<br>[ng/µl PCR-Ansatz] |  | 1   | 2     | 3     | 4     | Mittelwert<br>Ct-Werte | STABW<br>Ct-Werte |
| 125,00                                    |  | 24,50                                       | 24,76 | 24,86 | 24,52 | 24,66                  | 0,18              |
| 12,50                                     |  | 27,52                                       | 28,06 | 27,03 | 28,43 | 27,76                  | 0,61              |
| 1,25                                      |  | 30,91                                       | 30,43 | 31,55 | 30,51 | 30,85                  | 0,51              |
| 0,13                                      |  | 34,64                                       | 34,33 | 34,06 | 35,01 | 34,51                  | 0,41              |
| 0,013                                     |  | 37,57                                       | 37,22 | 39,56 | 38,71 | 38,27                  | 1,07              |

## (C) Optimierung Real-Time PCR Master-Mix Versuch 1

|  |          | Ct-Wert | $\Delta$ -R <sub>n</sub> -Wert |
|--|----------|---------|--------------------------------|
| Detektion<br><i>Phoma betae</i>            | Ansatz 1 | 24,65   | 315                            |
|  | Ansatz 2 | 24,18   | 450                            |
|  | Ansatz 3 | 24,66   | 295                            |
|  | Ansatz 4 | 25,27   | 280                            |
|  | Ansatz 5 | 24,67   | 275                            |
|  | Ansatz 6 | 23,76   | 315                            |
| Screening<br><i>Alternaria</i><br>Spezies  | Ansatz 1 | 20,31   | 770                            |
|  | Ansatz 2 | 20,48   | 1150                           |
|  | Ansatz 3 | 21,05   | 660                            |
|  | Ansatz 4 | 21,31   | 640                            |
|  | Ansatz 5 | 20,64   | 640                            |
|  | Ansatz 6 | 19,10   | 900                            |
| Detektion<br>Referenzgen aus<br>Zuckerrübe | Ansatz 1 | 26,12   | 405                            |
|  | Ansatz 2 | 25,47   | 420                            |
|  | Ansatz 3 | 25,66   | 395                            |
|  | Ansatz 4 | 26,94   | 220                            |
|  | Ansatz 5 | 25,36   | 480                            |
|  | Ansatz 6 | 24,61   | 570                            |

## (D) Optimierung Real-Time PCR Master-Mix Versuch 2

|   |          | Ct-Wert | $\Delta$ -R <sub>n</sub> -Wert |
|---|----------|---------|--------------------------------|
| Detektion<br><i>Phoma betae</i>               | Ansatz 1 | 24,37   | 400                            |
|   | Ansatz 2 | 24,52   | 300                            |
|   | Ansatz 3 | 23,81   | 500                            |
| Screening<br><i>Alternaria</i><br>Spezies     | Ansatz 1 | 20,36   | 750                            |
|   | Ansatz 2 | 20,19   | 600                            |
|   | Ansatz 3 | 19,05   | 1000                           |
| Detektion<br>Referenzgen<br>aus<br>Zuckerrübe | Ansatz 1 | 25,24   | 750                            |
|   | Ansatz 2 | 25,86   | 480                            |
|   | Ansatz 3 | 25,16   | 730                            |

## Übersicht Messdaten Praxisproben

## (E1) Gerstenmalz Proben Kategorie 1 - Teil 1 von 2 -

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |         | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status  | DON-Gehalt [ppb] |
| 1077               | Gerste | 1         | 37,23   | 21,09 | 21,50  | 0,00                | 1,87               | 897,31   | 0,00                | 2,08            | 0               | kein G. | <111             |
| 1054               | Gerste | 1         | 36,56   | 22,24 | 23,08  | 0,00                | 0,85               | 307,78   | 0,00                | 2,76            | 0               | kein G. | <111             |
| 1032               | Gerste | 1         | 38,00   | 24,87 | 24,68  | 0,00                | 0,14               | 104,15   | 0,00                | 1,34            | 0               | kein G. | <111             |
| 1044               | Gerste | 1         | 36,65   | 24,95 | 23,72  | 0,00                | 0,13               | 199,53   | 0,00                | 0,66            | 0               | kein G. | <111             |
| 1052               | Gerste | 1         | 37,03   | 24,16 | 24,51  | 0,00                | 0,23               | 116,85   | 0,00                | 1,95            | 0               | kein G. | <111             |
| 1010               | Gerste | 1         | 35,12   | 24,96 | 23,47  | 0,00                | 0,13               | 236,34   | 0,00                | 0,56            | 0               | kein G. | <111             |
| 18                 | Gerste | 1         | 34,18   | 23,16 | 22,88  | 0,00                | 0,45               | 352,42   | 0,00                | 1,28            | 0               | kein G. | <111             |
| 122                | Gerste | 1         | 33,04   | 25,20 | 22,12  | 0,00                | 0,11               | 589,64   | 0,00                | 0,19            | 0               | kein G. | <111             |
| 1057               | Gerste | 1         | 33,63   | 22,75 | 22,99  | 0,00                | 0,60               | 327,12   | 0,00                | 1,83            | 0               | kein G. | <111             |
| 120                | Gerste | 1         | 31,68   | 21,91 | 21,60  | 0,00                | 1,06               | 838,55   | 0,00                | 1,27            | 0               | kein G. | <111             |
| 1014               | Gerste | 1         | 34,09   | 24,86 | 24,18  | 0,00                | 0,14               | 146,12   | 0,00                | 0,96            | 0               | kein G. | <111             |
| 1023               | Gerste | 1         | 34,06   | 24,46 | 24,42  | 0,00                | 0,19               | 124,20   | 0,00                | 1,49            | 0               | kein G. | <111             |
| 1029               | Gerste | 1         | 31,81   | 22,95 | 22,20  | 0,00                | 0,52               | 558,55   | 0,00                | 0,93            | 0               | kein G. | <111             |
| 1080               | Gerste | 1         | 33,06   | 22,80 | 23,56  | 0,00                | 0,58               | 222,36   | 0,00                | 2,60            | 0               | kein G. | <111             |
| 1076               | Gerste | 1         | 30,59   | 22,42 | 21,42  | 0,00                | 0,75               | 947,26   | 0,00                | 0,79            | 0               | kein G. | <111             |
| 1005               | Gerste | 1         | 33,24   | 22,28 | 24,12  | 0,00                | 0,83               | 152,18   | 0,00                | 5,42            | 0               | kein G. | <111             |
| 108                | Gerste | 1         | 32,27   | 23,76 | 23,30  | 0,00                | 0,30               | 265,17   | 0,00                | 1,13            | 0               | kein G. | <111             |
| 1031               | Gerste | 1         | 32,88   | 24,74 | 24,01  | 0,00                | 0,15               | 163,95   | 0,00                | 0,93            | 0               | kein G. | <111             |
| 1013               | Gerste | 1         | 31,11   | 23,46 | 22,55  | 0,00                | 0,37               | 440,67   | 0,01                | 0,83            | 0               | kein G. | <111             |
| 176                | Gerste | 1         | 31,83   | 23,45 | 23,34  | 0,00                | 0,37               | 258,09   | 0,01                | 1,43            | 0               | kein G. | <111             |
| 1037               | Gerste | 1         | 32,55   | 24,41 | 24,11  | 0,00                | 0,19               | 153,21   | 0,01                | 1,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 1043               | Gerste | 1         | 32,39   | 23,98 | 24,07  | 0,00                | 0,26               | 157,42   | 0,01                | 1,64            | 0               | kein G. | <111             |
| 1042               | Gerste | 1         | 30,43   | 22,52 | 22,14  | 0,00                | 0,70               | 581,71   | 0,01                | 1,20            | 0               | kein G. | <111             |
| 1006               | Gerste | 1         | 33,20   | 25,21 | 24,94  | 0,00                | 0,11               | 87,33    | 0,01                | 1,27            | 0               | kein G. | <111             |
| 1085               | Gerste | 1         | 32,57   | 24,68 | 24,51  | 0,00                | 0,16               | 116,85   | 0,01                | 1,36            | 0               | kein G. | <111             |
| 198                | Gerste | 1         | 29,55   | 23,95 | 21,57  | 0,01                | 0,26               | 855,76   | 0,01                | 0,31            | 0               | kein G. | <111             |
| 1072               | Gerste | 1         | 31,93   | 25,64 | 23,97  | 0,00                | 0,08               | 168,45   | 0,01                | 0,49            | 0               | kein G. | <111             |
| 1063               | Gerste | 1         | 31,21   | 22,94 | 23,49  | 0,00                | 0,53               | 233,16   | 0,01                | 2,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 1090               | Gerste | 1         | 32,48   | 21,41 | 25,00  | 0,00                | 1,50               | 83,86    | 0,01                | 17,87           | 0               | kein G. | <111             |
| 93                 | Gerste | 1         | 28,27   | 23,07 | 20,82  | 0,02                | 0,48               | 1422,14  | 0,01                | 0,34            | 0               | kein G. | <111             |
| 105                | Gerste | 1         | 28,02   | 23,05 | 20,65  | 0,02                | 0,49               | 1595,66  | 0,01                | 0,31            | 0               | kein G. | <111             |
| 119                | Gerste | 1         | 27,57   | 20,51 | 20,29  | 0,03                | 2,78               | 2036,21  | 0,01                | 1,36            | 0               | kein G. | <111             |
| 1004               | Gerste | 1         | 31,42   | 22,66 | 24,32  | 0,00                | 0,64               | 132,90   | 0,02                | 4,79            | 0               | kein G. | <111             |
| 1019               | Gerste | 1         | 29,99   | 23,56 | 22,96  | 0,01                | 0,34               | 333,83   | 0,02                | 1,03            | 0               | kein G. | <111             |
| 1053               | Gerste | 1         | 31,37   | 23,19 | 24,35  | 0,00                | 0,44               | 130,23   | 0,02                | 3,40            | 0               | kein G. | <111             |
| 1026               | Gerste | 1         | 31,31   | 24,57 | 24,32  | 0,00                | 0,17               | 132,90   | 0,02                | 1,29            | 0               | kein G. | <111             |
| 149                | Gerste | 1         | 28,47   | 22,03 | 21,51  | 0,02                | 0,98               | 891,25   | 0,02                | 1,10            | 0               | kein G. | <111             |
| 1020               | Gerste | 1         | 30,00   | 23,68 | 23,16  | 0,01                | 0,32               | 291,55   | 0,02                | 1,08            | 0               | kein G. | <111             |
| 135                | Gerste | 1         | 27,98   | 21,15 | 21,20  | 0,02                | 1,79               | 1099,45  | 0,02                | 1,63            | 0               | kein G. | <111             |
| 168                | Gerste | 1         | 28,16   | 21,71 | 21,71  | 0,02                | 1,22               | 778,35   | 0,02                | 1,57            | 0               | kein G. | <111             |
| 94                 | Gerste | 1         | 27,18   | 20,46 | 20,75  | 0,04                | 2,87               | 1491,18  | 0,03                | 1,93            | 1               | kein G. | <111             |
| 7                  | Gerste | 1         | 30,41   | 24,53 | 24,21  | 0,00                | 0,18               | 143,18   | 0,03                | 1,23            | 0               | kein G. | <111             |
| 126                | Gerste | 1         | 26,64   | 23,24 | 20,58  | 0,05                | 0,43               | 1673,13  | 0,03                | 0,26            | 0               | kein G. | <111             |
| 1024               | Gerste | 1         | 30,69   | 23,61 | 24,62  | 0,00                | 0,33               | 108,47   | 0,03                | 3,06            | 0               | kein G. | <111             |
| 111                | Gerste | 1         | 28,74   | 20,59 | 22,70  | 0,01                | 2,63               | 398,11   | 0,03                | 6,60            | 1               | kein G. | <111             |
| 1083               | Gerste | 1         | 29,36   | 22,46 | 23,35  | 0,01                | 0,73               | 256,34   | 0,03                | 2,85            | 0               | kein G. | <111             |
| 173                | Gerste | 1         | 28,70   | 23,00 | 22,74  | 0,01                | 0,50               | 387,47   | 0,03                | 1,30            | 0               | kein G. | <111             |
| 137                | Gerste | 1         | 30,12   | 22,18 | 24,16  | 0,01                | 0,88               | 148,11   | 0,03                | 5,97            | 0               | kein G. | <111             |
| 134                | Gerste | 1         | 28,96   | 23,47 | 23,13  | 0,01                | 0,37               | 297,53   | 0,04                | 1,23            | 0               | kein G. | <111             |
| 124                | Gerste | 1         | 29,08   | 21,42 | 23,30  | 0,01                | 1,49               | 265,17   | 0,04                | 5,61            | 0               | kein G. | <111             |
| 182                | Gerste | 1         | 29,45   | 22,83 | 23,74  | 0,01                | 0,57               | 196,84   | 0,04                | 2,88            | 0               | kein G. | <111             |
| 187                | Gerste | 1         | 30,07   | 24,44 | 24,38  | 0,01                | 0,19               | 127,61   | 0,04                | 1,47            | 0               | kein G. | <111             |
| 131                | Gerste | 1         | 29,14   | 23,07 | 23,47  | 0,01                | 0,48               | 236,34   | 0,04                | 2,03            | 0               | kein G. | <111             |
| 35                 | Gerste | 1         | 25,66   | 20,49 | 20,11  | 0,10                | 2,81               | 2300,20  | 0,05                | 1,22            | 0               | kein G. | <111             |
| 1060               | Gerste | 1         | 28,74   | 24,07 | 23,20  | 0,01                | 0,24               | 283,75   | 0,05                | 0,85            | 0               | kein G. | <111             |
| 184                | Gerste | 1         | 29,53   | 23,16 | 23,99  | 0,01                | 0,45               | 166,18   | 0,05                | 2,72            | 0               | kein G. | <111             |
| 1007               | Gerste | 1         | 30,47   | 25,27 | 25,14  | 0,00                | 0,11               | 76,27    | 0,05                | 1,39            | 0               | kein G. | <111             |
| 1001               | Gerste | 1         | 30,39   | 23,62 | 25,08  | 0,00                | 0,33               | 79,43    | 0,05                | 4,15            | 0               | kein G. | <111             |
| 166                | Gerste | 1         | 28,40   | 22,45 | 23,12  | 0,02                | 0,73               | 299,55   | 0,05                | 2,45            | 0               | kein G. | <111             |
| 1065               | Gerste | 1         | 28,79   | 22,78 | 23,51  | 0,01                | 0,59               | 230,02   | 0,05                | 2,55            | 0               | kein G. | <111             |
| 1069               | Gerste | 1         | 30,43   | 22,55 | 25,21  | 0,00                | 0,69               | 72,74    | 0,06                | 9,43            | 0               | kein G. | <111             |
| 123                | Gerste | 1         | 27,48   | 21,29 | 22,28  | 0,03                | 1,63               | 529,09   | 0,06                | 3,07            | 0               | kein G. | <111             |
| 1056               | Gerste | 1         | 29,10   | 22,66 | 24,01  | 0,01                | 0,64               | 163,95   | 0,06                | 3,88            | 0               | kein G. | <111             |
| 28                 | Gerste | 1         | 28,18   | 21,92 | 23,17  | 0,02                | 1,06               | 289,58   | 0,07                | 3,65            | 0               | kein G. | <111             |
| 1091               | Gerste | 1         | 28,43   | 21,58 | 23,44  | 0,02                | 1,33               | 241,19   | 0,07                | 5,53            | 0               | kein G. | <111             |
| 8                  | Gerste | 1         | 29,09   | 24,72 | 24,10  | 0,01                | 0,16               | 154,25   | 0,07                | 1,01            | 0               | kein G. | <111             |
| 162                | Gerste | 1         | 27,58   | 22,05 | 22,62  | 0,03                | 0,97               | 420,27   | 0,07                | 2,30            | 0               | kein G. | <111             |
| 164                | Gerste | 1         | 28,15   | 21,40 | 23,20  | 0,02                | 1,51               | 283,75   | 0,07                | 5,32            | 0               | kein G. | <111             |
| 1018               | Gerste | 1         | 29,04   | 24,45 | 24,10  | 0,01                | 0,19               | 154,25   | 0,07                | 1,21            | 0               | kein G. | <111             |
| 107                | Gerste | 1         | 26,94   | 20,81 | 22,04  | 0,04                | 2,26               | 622,47   | 0,07                | 3,63            | 0               | kein G. | <111             |
| 1036               | Gerste | 1         | 28,82   | 23,75 | 23,92  | 0,01                | 0,30               | 174,25   | 0,07                | 1,73            | 0               | kein G. | <111             |
| 34                 | Gerste | 1         | 28,22   | 24,01 | 23,33  | 0,02                | 0,25               | 259,84   | 0,07                | 0,97            | 0               | kein G. | <111             |
| 1011               | Gerste | 1         | 30,90   | 24,71 | 26,01  | 0,00                | 0,16               | 42,31    | 0,07                | 3,69            | 0               | kein G. | <111             |
| 1064               | Gerste | 1         | 28,49   | 22,47 | 23,62  | 0,02                | 0,72               | 213,51   | 0,07                | 3,39            | 0               | kein G. | <111             |
| 15                 | Gerste | 1         | 27,93   | 24,31 | 23,07  | 0,02                | 0,21               | 309,87   | 0,07                | 0,66            | 0               | kein G. | <111             |
| 1025               | Gerste | 1         | 29,75   | 24,19 | 24,96  | 0,01                | 0,22               | 86,16    | 0,08                | 2,59            | 0               | kein G. | <111             |
| 1073               | Gerste | 1         | 29,72   | 22,67 | 25,10  | 0,01                | 0,63               | 78,36    | 0,09                | 8,06            | 0               | kein G. | <111             |
| 1012               | Gerste | 1         | 29,34   | 25,44 | 24,74  | 0,01                | 0,09               | 100,00   | 0,09                | 0,95            | 0               | kein G. | <111             |
| 158                | Gerste | 1         | 28,20   | 22,34 | 23,71  | 0,02                | 0,79               | 200,88   | 0,09                | 3,94            | 0               | kein G. | <111             |
| 130                | Gerste | 1         | 28,68   | 22,50 | 24,19  | 0,01                | 0,71               | 145,13   | 0,09                | 4,89            | 0               | kein G. | <111             |

## (E1) Gerstenmalz Proben Kategorie 1 - Teil 2 von 2 -

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |         | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |         | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|---------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPIY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status  | DON-Gehalt [ppb] |
| 1002               | Gerste | 1         | 28,85   | 24,56 | 24,52   | 0,01                | 0,17               | 116,07   | 0,10                | 1,49            | 0               | kein G. | <111             |
| 170                | Gerste | 1         | 26,78   | 21,99 | 22,49   | 0,05                | 1,01               | 458,95   | 0,11                | 2,19            | 0               | kein G. | <111             |
| 114                | Gerste | 1         | 28,28   | 20,90 | 24,01   | 0,02                | 2,13               | 163,95   | 0,11                | 12,96           | 0               | kein G. | <111             |
| 117                | Gerste | 1         | 25,33   | 21,02 | 21,09   | 0,13                | 1,96               | 1184,48  | 0,11                | 1,65            | 0               | kein G. | <111             |
| 14                 | Gerste | 1         | 27,28   | 23,11 | 23,07   | 0,03                | 0,47               | 309,87   | 0,11                | 1,51            | 0               | kein G. | <111             |
| 17                 | Gerste | 1         | 27,51   | 24,49 | 23,34   | 0,03                | 0,18               | 258,09   | 0,12                | 0,70            | 0               | kein G. | <111             |
| 37                 | Gerste | 1         | 25,16   | 19,45 | 21,08   | 0,15                | 5,74               | 1192,53  | 0,12                | 4,81            | 0               | kein G. | <111             |
| 1066               | Gerste | 1         | 28,14   | 23,31 | 24,06   | 0,02                | 0,41               | 158,49   | 0,12                | 2,57            | 0               | kein G. | <111             |
| 151                | Gerste | 1         | 26,64   | 22,07 | 22,57   | 0,05                | 0,95               | 434,75   | 0,12                | 2,19            | 0               | kein G. | <111             |
| 153                | Gerste | 1         | 27,17   | 21,70 | 23,21   | 0,04                | 1,23               | 281,84   | 0,13                | 4,36            | 0               | kein G. | <111             |
| 53                 | Gerste | 1         | 26,57   | 21,29 | 22,63   | 0,06                | 1,63               | 417,43   | 0,13                | 3,90            | 0               | kein G. | <111             |
| 171                | Gerste | 1         | 26,05   | 22,53 | 22,21   | 0,08                | 0,70               | 554,78   | 0,14                | 1,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 195                | Gerste | 1         | 25,80   | 23,56 | 22,00   | 0,09                | 0,34               | 639,56   | 0,15                | 0,54            | 0               | kein G. | <111             |
| 1075               | Gerste | 1         | 29,17   | 22,14 | 25,51   | 0,01                | 0,91               | 59,36    | 0,16                | 15,30           | 0               | kein G. | <111             |
| 77                 | Gerste | 1         | 26,81   | 22,83 | 23,17   | 0,05                | 0,57               | 289,58   | 0,17                | 1,96            | 0               | kein G. | <111             |
| 21                 | Gerste | 1         | 26,61   | 22,45 | 23,14   | 0,05                | 0,73               | 295,52   | 0,19                | 2,49            | 0               | kein G. | <111             |
| 118                | Gerste | 1         | 27,79   | 23,55 | 24,34   | 0,02                | 0,35               | 131,11   | 0,19                | 2,64            | 1               | kein G. | <111             |
| 133                | Gerste | 1         | 26,85   | 23,07 | 23,53   | 0,05                | 0,48               | 226,93   | 0,21                | 2,12            | 0               | kein G. | <111             |
| 4                  | Gerste | 1         | 27,10   | 23,78 | 23,78   | 0,04                | 0,30               | 191,58   | 0,21                | 1,54            | 0               | kein G. | <111             |
| 106                | Gerste | 1         | 25,73   | 21,28 | 22,43   | 0,10                | 1,64               | 477,98   | 0,21                | 3,43            | 0               | kein G. | <111             |
| 172                | Gerste | 1         | 26,22   | 22,16 | 22,93   | 0,07                | 0,90               | 340,68   | 0,21                | 2,63            | 0               | kein G. | <111             |
| 1021               | Gerste | 1         | 27,86   | 23,51 | 24,68   | 0,02                | 0,36               | 104,15   | 0,23                | 3,41            | 0               | kein G. | <111             |
| 78                 | Gerste | 1         | 25,64   | 20,84 | 22,50   | 0,11                | 2,21               | 455,85   | 0,23                | 4,86            | 0               | kein G. | <111             |
| 1079               | Gerste | 1         | 27,35   | 22,15 | 24,28   | 0,03                | 0,90               | 136,55   | 0,24                | 6,61            | 0               | kein G. | <111             |
| 47                 | Gerste | 1         | 26,86   | 21,96 | 23,86   | 0,05                | 1,03               | 181,48   | 0,26                | 5,66            | 0               | kein G. | <111             |
| 48                 | Gerste | 1         | 26,14   | 22,08 | 23,20   | 0,08                | 0,95               | 283,75   | 0,27                | 3,34            | 0               | kein G. | <111             |
| 165                | Gerste | 1         | 25,61   | 21,35 | 22,69   | 0,11                | 1,56               | 400,81   | 0,27                | 3,90            | 0               | kein G. | <111             |
| 1067               | Gerste | 1         | 27,31   | 24,07 | 24,41   | 0,03                | 0,24               | 125,04   | 0,27                | 1,94            | 0               | kein G. | <111             |
| 160                | Gerste | 1         | 26,08   | 21,61 | 23,20   | 0,08                | 1,31               | 283,75   | 0,28                | 4,60            | 0               | kein G. | <111             |
| 199                | Gerste | 1         | 25,72   | 21,93 | 22,90   | 0,10                | 1,05               | 347,68   | 0,29                | 3,02            | 0               | kein G. | <111             |
| 50                 | Gerste | 1         | 25,77   | 21,27 | 22,96   | 0,10                | 1,65               | 333,83   | 0,29                | 4,94            | 4               | kein G. | <111             |
| 1045               | Gerste | 1         | 27,99   | 24,10 | 25,26   | 0,02                | 0,24               | 70,32    | 0,31                | 3,37            | 0               | kein G. | <111             |
| 40                 | Gerste | 1         | 25,87   | 23,47 | 23,39   | 0,09                | 0,37               | 249,49   | 0,36                | 1,46            | 0               | kein G. | <111             |
| 1068               | Gerste | 1         | 26,09   | 22,66 | 23,64   | 0,08                | 0,64               | 210,63   | 0,37                | 3,02            | 0               | kein G. | <111             |
| 1082               | Gerste | 1         | 25,81   | 24,02 | 23,46   | 0,09                | 0,25               | 237,94   | 0,40                | 1,05            | 0               | kein G. | <111             |
| 30                 | Gerste | 1         | 26,04   | 23,37 | 23,70   | 0,08                | 0,39               | 202,25   | 0,40                | 1,93            | 0               | kein G. | <111             |
| 52                 | Gerste | 1         | 25,15   | 20,29 | 23,01   | 0,15                | 3,23               | 322,72   | 0,46                | 10,00           | 0               | kein G. | <111             |
| 29                 | Gerste | 1         | 26,05   | 22,19 | 24,10   | 0,08                | 0,88               | 154,25   | 0,52                | 5,69            | 0               | kein G. | <111             |
| 183                | Gerste | 1         | 26,27   | 22,75 | 24,33   | 0,07                | 0,60               | 132,00   | 0,52                | 4,53            | 0               | kein G. | <111             |
| 1030               | Gerste | 1         | 25,56   | 23,49 | 23,68   | 0,11                | 0,36               | 205,01   | 0,54                | 1,76            | 0               | kein G. | <111             |
| 1084               | Gerste | 1         | 24,73   | 21,19 | 22,86   | 0,20                | 1,74               | 357,22   | 0,55                | 4,88            | 0               | kein G. | <111             |
| 1028               | Gerste | 1         | 26,95   | 22,65 | 25,14   | 0,04                | 0,64               | 76,27    | 0,57                | 8,40            | 0               | kein G. | <111             |
| 188                | Gerste | 1         | 25,82   | 22,77 | 24,10   | 0,09                | 0,59               | 154,25   | 0,61                | 3,82            | 0               | kein G. | <111             |
| 46                 | Gerste | 1         | 24,06   | 22,18 | 22,63   | 0,31                | 0,88               | 417,43   | 0,73                | 2,12            | 0               | kein G. | <111             |
| 79                 | Gerste | 1         | 24,88   | 22,54 | 23,46   | 0,18                | 0,69               | 237,94   | 0,74                | 2,90            | 0               | kein G. | <111             |
| 163                | Gerste | 1         | 24,72   | 21,20 | 23,33   | 0,20                | 1,73               | 259,84   | 0,76                | 6,66            | 1               | kein G. | <111             |
| 51                 | Gerste | 1         | 24,16   | 20,42 | 22,92   | 0,29                | 2,95               | 343,00   | 0,84                | 8,61            | 0               | kein G. | <111             |
| 129                | Gerste | 1         | 24,47   | 21,76 | 23,38   | 0,23                | 1,18               | 251,19   | 0,93                | 4,69            | 0               | kein G. | <111             |
| 1027               | Gerste | 1         | 26,00   | 24,04 | 24,99   | 0,08                | 0,25               | 84,42    | 0,98                | 2,93            | 0               | kein G. | <111             |
| 157                | Gerste | 1         | 23,90   | 21,52 | 22,99   | 0,34                | 1,39               | 327,12   | 1,04                | 4,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 127                | Gerste | 1         | 23,32   | 22,04 | 22,92   | 0,51                | 0,97               | 343,00   | 1,47                | 2,84            | 0               | kein G. | <111             |

## (E2) Gerstenmalz Proben Kategorie 2

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |         | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status  | DON-Gehalt [ppb] |
| 147                | Gerste | 2         | 27,69   | 21,04 | 21,87  | 0,03                | 1,93               | 698,42   | 0,04                | 2,76            | 0               | kein G. | 112              |
| 1038               | Gerste | 2         | 29,66   | 23,23 | 23,85  | 0,01                | 0,43               | 182,71   | 0,04                | 2,36            | 0               | kein G. | 112              |
| 116                | Gerste | 2         | 27,81   | 21,71 | 22,50  | 0,02                | 1,22               | 455,85   | 0,05                | 2,68            | 0               | kein G. | 124              |
| 39                 | Gerste | 2         | 27,58   | 22,09 | 22,31  | 0,03                | 0,94               | 518,45   | 0,05                | 1,81            | 0               | kein G. | 146              |
| 1097               | Gerste | 2         | 28,52   | 24,34 | 23,34  | 0,02                | 0,20               | 258,09   | 0,06                | 0,78            | 0               | kein G. | 112              |
| 1051               | Gerste | 2         | 29,68   | 22,92 | 24,97  | 0,01                | 0,53               | 85,58    | 0,08                | 6,22            | 1               | kein G. | 128              |
| 1098               | Gerste | 2         | 28,51   | 22,87 | 24,05  | 0,02                | 0,55               | 159,57   | 0,10                | 3,45            | 0               | kein G. | 147              |
| 1096               | Gerste | 2         | 28,07   | 22,94 | 23,69  | 0,02                | 0,53               | 203,62   | 0,10                | 2,58            | 0               | kein G. | 128              |
| 1059               | Gerste | 2         | 26,80   | 20,82 | 22,82  | 0,05                | 2,24               | 367,03   | 0,13                | 6,12            | 0               | kein G. | 145              |
| 1070               | Gerste | 2         | 26,38   | 22,80 | 22,83  | 0,06                | 0,58               | 364,56   | 0,18                | 1,59            | 0               | kein G. | 131              |
| 115                | Gerste | 2         | 24,80   | 20,31 | 21,30  | 0,19                | 3,18               | 1027,46  | 0,18                | 3,10            | 1               | kein G. | 131              |
| 1046               | Gerste | 2         | 27,00   | 23,56 | 24,22  | 0,04                | 0,34               | 142,21   | 0,30                | 2,41            | 1               | kein G. | 123              |
| 193                | Gerste | 2         | 26,27   | 22,70 | 23,76  | 0,07                | 0,62               | 194,19   | 0,36                | 3,19            | 0               | kein G. | 169              |
| 1058               | Gerste | 2         | 24,28   | 22,46 | 22,59  | 0,26                | 0,73               | 428,90   | 0,62                | 1,70            | 1               | kein G. | 150              |
| 169                | Gerste | 2         | 25,77   | 21,35 | 24,47  | 0,10                | 1,56               | 120,06   | 0,81                | 13,00           | 0               | kein G. | 173              |
| 1015               | Gerste | 2         | 25,33   | 23,24 | 24,18  | 0,13                | 0,43               | 146,12   | 0,89                | 2,93            | 0               | kein G. | 112              |
| 1101               | Gerste | 2         | 25,32   | 22,93 | 24,18  | 0,13                | 0,53               | 146,12   | 0,90                | 3,62            | 0               | kein G. | 142              |
| 1087               | Gerste | 2         | 25,38   | 25,07 | 24,37  | 0,13                | 0,12               | 128,48   | 0,98                | 0,95            | 0               | kein G. | 145              |
| 1008               | Gerste | 2         | 24,75   | 23,84 | 24,21  | 0,19                | 0,28               | 143,18   | 1,34                | 1,98            | 0               | kein G. | 256              |
| 1003               | Gerste | 2         | 25,61   | 24,29 | 25,28  | 0,11                | 0,21               | 69,37    | 1,55                | 3,00            | 0               | kein G. | 383              |
| 72                 | Gerste | 2         | 21,32   | 21,04 | 21,35  | 1,95                | 1,93               | 993,25   | 1,96                | 1,94            | 1               | kein G. | 214              |
| 141                | Gerste | 2         | 21,01   | 20,07 | 21,20  | 2,41                | 3,75               | 1099,45  | 2,19                | 3,41            | 0               | kein G. | 113              |
| 66                 | Gerste | 2         | 21,30   | 21,05 | 21,69  | 1,98                | 1,92               | 788,97   | 2,51                | 2,43            | 0               | kein G. | 312              |
| 1047               | Gerste | 2         | 23,77   | 22,35 | 24,51  | 0,37                | 0,79               | 116,85   | 3,19                | 6,73            | 0               | kein G. | 113              |
| 112                | Gerste | 2         | 21,27   | 18,63 | 22,19  | 2,02                | 10,07              | 562,34   | 3,59                | 17,91           | 1               | kein G. | 700              |
| 69                 | Gerste | 2         | 21,80   | 21,21 | 23,11  | 1,41                | 1,72               | 301,59   | 4,68                | 5,70            | 2               | kein G. | 385              |
| 80                 | Gerste | 2         | 21,55   | 21,06 | 23,35  | 1,67                | 1,90               | 256,34   | 6,52                | 7,43            | 0               | kein G. | 402              |

## (E3) Gerstenmalz Proben Kategorie 3

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |            | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status     | DON-Gehalt [ppb] |
| 49                 | Gerste | 3         | 26,97   | 22,99 | 23,54  | 0,04                | 0,51               | 225,39   | 0,19                | 2,25            | 7               | 50%Gushing | <111             |
| 55                 | Gerste | 3         | 25,19   | 20,23 | 22,72  | 0,14                | 3,36               | 392,75   | 0,36                | 8,56            | 5               | 50%Gushing | <111             |
| 54                 | Gerste | 3         | 25,14   | 21,15 | 23,40  | 0,15                | 1,79               | 247,81   | 0,60                | 7,23            | 8               | 50%Gushing | <111             |
| 76                 | Gerste | 3         | 25,21   | 22,31 | 23,58  | 0,14                | 0,81               | 219,37   | 0,64                | 3,69            | 21              | 50%Gushing | <111             |

## (E4) Gerstenmalz Proben Kategorie 4

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |             | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status      | DON-Gehalt [ppb] |
| 104                | Gerste | 4         | 25,15   | 21,09 | 21,21  | 0,15                | 1,87               | 1092,03  | 0,13                | 1,71            | 5               | 50% Gushing | 145              |
| 121                | Gerste | 4         | 23,55   | 21,09 | 22,69  | 0,43                | 1,87               | 400,81   | 1,08                | 4,65            | 12              | 50% Gushing | 256              |
| 1081               | Gerste | 4         | 24,78   | 20,46 | 24,44  | 0,19                | 2,87               | 122,53   | 1,54                | 23,45           | 43              | 50% Gushing | 900              |
| 1086               | Gerste | 4         | 24,44   | 20,72 | 24,60  | 0,24                | 2,40               | 109,95   | 2,16                | 21,87           | 59              | 50% Gushing | 350              |
| 1049               | Gerste | 4         | 24,15   | 22,06 | 24,51  | 0,29                | 0,96               | 116,85   | 2,47                | 8,21            | 59              | 92% Gushing | 1650             |
| 185                | Gerste | 4         | 20,97   | 19,51 | 21,34  | 2,47                | 5,51               | 1000,00  | 2,47                | 5,51            | 167             | 92% Gushing | 1650             |
| 113                | Gerste | 4         | 21,46   | 19,14 | 22,11  | 1,78                | 7,10               | 593,65   | 2,99                | 11,96           | 22              | 50% Gushing | 400              |
| 161                | Gerste | 4         | 22,66   | 20,03 | 24,06  | 0,79                | 3,86               | 158,49   | 4,98                | 24,34           | 43              | 50% Gushing | 910              |
| 81                 | Gerste | 4         | 21,49   | 20,74 | 23,44  | 1,74                | 2,37               | 241,19   | 7,21                | 9,83            | 6               | 50% Gushing | 403              |
| 136                | Gerste | 4         | 21,31   | 19,88 | 24,09  | 1,96                | 4,28               | 155,30   | 12,65               | 27,53           | 197             | 92% Gushing | 700              |

## (E5) Weizenmalz Proben Kategorie 1

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |         | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status  | DON-Gehalt [ppb] |
| 16                 | Weizen | 1         | 45,00   | 25,77 | 23,04  | 0,00                | 0,08               | 316,23   | 0,00                | 0,24            | 0               | kein G. | <111             |
| 11                 | Weizen | 1         | 45,00   | 27,11 | 23,18  | 0,00                | 0,03               | 287,62   | 0,00                | 0,10            | 0               | kein G. | <111             |
| 90                 | Weizen | 1         | 38,26   | 24,46 | 21,44  | 0,00                | 0,19               | 934,52   | 0,00                | 0,20            | 0               | kein G. | <111             |
| 13                 | Weizen | 1         | 37,52   | 25,64 | 22,94  | 0,00                | 0,08               | 338,39   | 0,00                | 0,24            | 0               | kein G. | <111             |
| 138                | Weizen | 1         | 34,78   | 24,46 | 21,83  | 0,00                | 0,19               | 717,60   | 0,00                | 0,26            | 0               | kein G. | <111             |
| 23                 | Weizen | 1         | 34,65   | 29,26 | 23,33  | 0,00                | 0,01               | 259,84   | 0,00                | 0,03            | 0               | kein G. | <111             |
| 143                | Weizen | 1         | 32,73   | 27,00 | 21,89  | 0,00                | 0,03               | 689,03   | 0,00                | 0,05            | 0               | kein G. | <111             |
| 1055               | Weizen | 1         | 34,60   | 27,53 | 23,94  | 0,00                | 0,02               | 171,91   | 0,00                | 0,13            | 0               | kein G. | <111             |
| 56                 | Weizen | 1         | 33,21   | 26,12 | 22,81  | 0,00                | 0,06               | 369,53   | 0,00                | 0,16            | 0               | kein G. | <111             |
| 125                | Weizen | 1         | 32,11   | 25,55 | 21,77  | 0,00                | 0,09               | 747,36   | 0,00                | 0,12            | 0               | kein G. | <111             |
| 68                 | Weizen | 1         | 32,39   | 26,24 | 22,14  | 0,00                | 0,05               | 581,71   | 0,00                | 0,09            | 0               | kein G. | <111             |
| 85                 | Weizen | 1         | 31,87   | 26,99 | 21,64  | 0,00                | 0,03               | 816,14   | 0,00                | 0,04            | 0               | kein G. | <111             |
| 70                 | Weizen | 1         | 31,44   | 26,18 | 21,76  | 0,00                | 0,06               | 752,44   | 0,00                | 0,08            | 0               | kein G. | <111             |
| 167                | Weizen | 1         | 31,68   | 24,31 | 22,21  | 0,00                | 0,21               | 554,78   | 0,00                | 0,37            | 0               | kein G. | <111             |
| 152                | Weizen | 1         | 32,04   | 25,41 | 22,85  | 0,00                | 0,10               | 359,65   | 0,00                | 0,27            | 0               | kein G. | <111             |
| 110                | Weizen | 1         | 31,12   | 23,63 | 22,21  | 0,00                | 0,33               | 554,78   | 0,00                | 0,59            | 0               | kein G. | <111             |
| 150                | Weizen | 1         | 30,53   | 23,46 | 21,95  | 0,00                | 0,37               | 661,59   | 0,01                | 0,96            | 0               | kein G. | <111             |
| 22                 | Weizen | 1         | 31,52   | 27,22 | 23,05  | 0,00                | 0,03               | 314,09   | 0,01                | 0,09            | 0               | kein G. | <111             |
| 91                 | Weizen | 1         | 29,56   | 25,32 | 21,33  | 0,01                | 0,10               | 1006,80  | 0,01                | 0,10            | 0               | kein G. | <111             |
| 74                 | Weizen | 1         | 30,40   | 25,73 | 22,31  | 0,00                | 0,08               | 518,45   | 0,01                | 0,15            | 0               | kein G. | <111             |
| 84                 | Weizen | 1         | 31,08   | 26,82 | 23,15  | 0,00                | 0,04               | 293,53   | 0,01                | 0,13            | 0               | kein G. | <111             |
| 88                 | Weizen | 1         | 28,84   | 25,18 | 20,94  | 0,01                | 0,11               | 1311,13  | 0,01                | 0,09            | 0               | kein G. | <111             |
| 1034               | Weizen | 1         | 32,85   | 27,81 | 25,02  | 0,00                | 0,02               | 82,73    | 0,01                | 0,23            | 0               | kein G. | <111             |
| 75                 | Weizen | 1         | 30,94   | 26,16 | 23,14  | 0,00                | 0,06               | 295,52   | 0,01                | 0,20            | 0               | kein G. | <111             |
| 41                 | Weizen | 1         | 30,32   | 25,89 | 22,74  | 0,00                | 0,07               | 387,47   | 0,01                | 0,18            | 0               | kein G. | <111             |
| 103                | Weizen | 1         | 28,54   | 23,12 | 21,12  | 0,01                | 0,46               | 1160,66  | 0,01                | 0,40            | 0               | kein G. | <111             |
| 59                 | Weizen | 1         | 31,07   | 25,59 | 23,85  | 0,00                | 0,09               | 182,71   | 0,01                | 0,47            | 0               | kein G. | <111             |
| 64                 | Weizen | 1         | 30,42   | 26,09 | 23,29  | 0,00                | 0,06               | 266,97   | 0,02                | 0,23            | 0               | kein G. | <111             |
| 38                 | Weizen | 1         | 31,14   | 26,32 | 24,07  | 0,00                | 0,05               | 157,42   | 0,02                | 0,33            | 0               | kein G. | <111             |
| 73                 | Weizen | 1         | 29,37   | 25,95 | 22,37  | 0,01                | 0,07               | 497,80   | 0,02                | 0,13            | 0               | kein G. | <111             |
| 65                 | Weizen | 1         | 28,13   | 25,66 | 21,44  | 0,02                | 0,08               | 934,52   | 0,02                | 0,09            | 0               | kein G. | <111             |
| 67                 | Weizen | 1         | 28,23   | 25,00 | 21,82  | 0,02                | 0,13               | 722,48   | 0,03                | 0,18            | 0               | kein G. | <111             |
| 109                | Weizen | 1         | 28,17   | 25,27 | 22,03  | 0,02                | 0,11               | 626,70   | 0,03                | 0,17            | 0               | kein G. | <111             |
| 154                | Weizen | 1         | 28,28   | 24,71 | 22,27  | 0,02                | 0,16               | 532,69   | 0,03                | 0,29            | 0               | kein G. | <111             |
| 9                  | Weizen | 1         | 27,06   | 25,14 | 21,10  | 0,04                | 0,12               | 1176,49  | 0,03                | 0,10            | 0               | kein G. | <111             |
| 44                 | Weizen | 1         | 28,88   | 26,21 | 23,05  | 0,01                | 0,06               | 314,09   | 0,04                | 0,18            | 0               | kein G. | <111             |
| 92                 | Weizen | 1         | 26,87   | 24,37 | 21,07  | 0,05                | 0,20               | 1200,64  | 0,04                | 0,16            | 0               | kein G. | <111             |
| 100                | Weizen | 1         | 28,77   | 24,56 | 22,97  | 0,01                | 0,17               | 331,58   | 0,04                | 0,52            | 0               | kein G. | <111             |
| 60                 | Weizen | 1         | 29,68   | 24,58 | 23,88  | 0,01                | 0,17               | 179,04   | 0,04                | 0,95            | 0               | kein G. | <111             |
| 82                 | Weizen | 1         | 28,93   | 26,15 | 23,22  | 0,01                | 0,06               | 279,94   | 0,04                | 0,21            | 0               | kein G. | <111             |
| 174                | Weizen | 1         | 28,25   | 24,60 | 23,16  | 0,02                | 0,17               | 291,55   | 0,06                | 0,58            | 0               | kein G. | <111             |
| 1095               | Weizen | 1         | 30,91   | 27,48 | 25,95  | 0,00                | 0,02               | 44,07    | 0,07                | 0,53            | 0               | kein G. | <111             |
| 24                 | Weizen | 1         | 28,01   | 26,04 | 23,12  | 0,02                | 0,06               | 299,55   | 0,07                | 0,21            | 0               | kein G. | <111             |
| 58                 | Weizen | 1         | 27,53   | 25,69 | 23,03  | 0,03                | 0,08               | 318,38   | 0,09                | 0,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 10                 | Weizen | 1         | 26,73   | 23,65 | 22,25  | 0,05                | 0,32               | 539,95   | 0,09                | 0,60            | 1               | kein G. | <111             |
| 32                 | Weizen | 1         | 27,73   | 25,83 | 23,40  | 0,03                | 0,07               | 247,81   | 0,10                | 0,29            | 0               | kein G. | <111             |
| 20                 | Weizen | 1         | 27,95   | 26,54 | 23,81  | 0,02                | 0,04               | 187,73   | 0,12                | 0,24            | 0               | kein G. | <111             |
| 1094               | Weizen | 1         | 28,15   | 25,75 | 24,15  | 0,02                | 0,08               | 149,12   | 0,13                | 0,51            | 0               | kein G. | <111             |
| 1009               | Weizen | 1         | 28,31   | 26,86 | 24,31  | 0,02                | 0,04               | 133,80   | 0,13                | 0,27            | 0               | kein G. | <111             |
| 12                 | Weizen | 1         | 26,82   | 26,02 | 22,90  | 0,05                | 0,06               | 347,68   | 0,14                | 0,18            | 0               | kein G. | <111             |
| 19                 | Weizen | 1         | 27,03   | 25,70 | 23,13  | 0,04                | 0,08               | 297,53   | 0,14                | 0,27            | 0               | kein G. | <111             |
| 89                 | Weizen | 1         | 26,17   | 24,32 | 22,29  | 0,07                | 0,20               | 525,52   | 0,14                | 0,39            | 0               | kein G. | <111             |
| 102                | Weizen | 1         | 27,30   | 22,46 | 23,48  | 0,03                | 0,73               | 234,74   | 0,15                | 3,11            | 0               | kein G. | <111             |
| 145                | Weizen | 1         | 26,33   | 25,21 | 22,53  | 0,07                | 0,11               | 446,68   | 0,15                | 0,25            | 0               | kein G. | <111             |
| 1089               | Weizen | 1         | 26,05   | 23,01 | 22,32  | 0,08                | 0,50               | 514,95   | 0,16                | 0,97            | 0               | kein G. | <111             |
| 1                  | Weizen | 1         | 27,11   | 26,09 | 23,50  | 0,04                | 0,06               | 231,58   | 0,17                | 0,26            | 0               | kein G. | <111             |
| 31                 | Weizen | 1         | 26,70   | 25,15 | 23,11  | 0,05                | 0,12               | 301,59   | 0,17                | 0,38            | 0               | kein G. | <111             |
| 25                 | Weizen | 1         | 26,77   | 26,30 | 23,23  | 0,05                | 0,05               | 278,05   | 0,18                | 0,19            | 0               | kein G. | <111             |
| 2                  | Weizen | 1         | 27,17   | 26,34 | 23,63  | 0,04                | 0,05               | 212,07   | 0,18                | 0,24            | 0               | kein G. | <111             |
| 156                | Weizen | 1         | 25,76   | 24,16 | 22,24  | 0,10                | 0,23               | 543,62   | 0,18                | 0,42            | 0               | kein G. | <111             |
| 83                 | Weizen | 1         | 25,72   | 24,60 | 22,84  | 0,10                | 0,17               | 362,10   | 0,28                | 0,46            | 0               | kein G. | <111             |
| 27                 | Weizen | 1         | 26,50   | 25,60 | 23,68  | 0,06                | 0,08               | 205,01   | 0,29                | 0,41            | 0               | kein G. | <111             |
| 1093               | Weizen | 1         | 26,17   | 24,76 | 23,51  | 0,07                | 0,15               | 230,02   | 0,32                | 0,66            | 0               | kein G. | <111             |
| 1033               | Weizen | 1         | 26,65   | 25,69 | 24,33  | 0,05                | 0,08               | 132,00   | 0,40                | 0,60            | 0               | kein G. | <111             |
| 5                  | Weizen | 1         | 26,02   | 25,13 | 24,11  | 0,08                | 0,12               | 153,21   | 0,53                | 0,76            | 0               | kein G. | <111             |
| 6                  | Weizen | 1         | 25,20   | 24,84 | 23,80  | 0,14                | 0,14               | 189,00   | 0,75                | 0,76            | 0               | kein G. | <111             |
| 128                | Weizen | 1         | 24,64   | 23,66 | 23,33  | 0,21                | 0,32               | 259,84   | 0,80                | 1,23            | 0               | kein G. | <111             |
| 57                 | Weizen | 1         | 25,13   | 24,05 | 23,86  | 0,15                | 0,25               | 181,48   | 0,82                | 1,35            | 0               | kein G. | <111             |
| 3                  | Weizen | 1         | 24,79   | 24,46 | 23,77  | 0,19                | 0,19               | 192,88   | 0,97                | 0,96            | 0               | kein G. | <111             |

## (E6) Weizenmalz Proben Kategorie 2

| Probenbeschreibung |        |           | Ct-Wert |       |        | DNA-Menge           |                    |          | Belastungsindex     |                 | Gushing         |         | Mykotoxine       |
|--------------------|--------|-----------|---------|-------|--------|---------------------|--------------------|----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------|------------------|
| Lfd.-Nr.           | Sorte  | Kategorie | FAM     | HEX   | BODIPY | Gruppe Toxinbildner | Fusarium insgesamt | Getreide | Gruppe Toxinbildner | Gesamtbelastung | MCT (USV in ml) | Status  | DON-Gehalt [ppb] |
| 146                | Weizen | 2         | 29,62   | 25,85 | 21,93  | 0,01                | 0,07               | 670,61   | 0,01                | 0,11            | 0               | kein G. | 114              |
| 196                | Weizen | 2         | 27,92   | 23,18 | 22,17  | 0,02                | 0,45               | 570,01   | 0,04                | 0,78            | 0               | kein G. | 150              |
| 1050               | Weizen | 2         | 29,45   | 25,88 | 24,76  | 0,01                | 0,07               | 98,65    | 0,08                | 0,71            | 0               | kein G. | 148              |
| 194                | Weizen | 2         | 26,81   | 23,74 | 22,54  | 0,05                | 0,30               | 443,67   | 0,11                | 0,68            | 0               | kein G. | 119              |
| 180                | Weizen | 2         | 26,72   | 23,19 | 22,77  | 0,05                | 0,44               | 379,67   | 0,13                | 1,17            | 0               | kein G. | 163              |
| 178                | Weizen | 2         | 25,39   | 22,80 | 22,61  | 0,12                | 0,58               | 423,13   | 0,30                | 1,37            | 0               | kein G. | 119              |
| 1022               | Weizen | 2         | 26,99   | 23,57 | 24,48  | 0,04                | 0,34               | 119,25   | 0,36                | 2,86            | 1               | kein G. | 125              |
| 36                 | Weizen | 2         | 26,15   | 24,23 | 23,79  | 0,07                | 0,22               | 190,29   | 0,39                | 1,14            | 0               | kein G. | 115              |
| 1040               | Weizen | 2         | 26,57   | 25,03 | 24,60  | 0,06                | 0,13               | 109,95   | 0,51                | 1,14            | 0               | kein G. | 119              |
| 191                | Weizen | 2         | 24,06   | 23,36 | 22,11  | 0,31                | 0,39               | 593,65   | 0,52                | 0,66            | 0               | kein G. | 169              |
| 1035               | Weizen | 2         | 24,81   | 23,08 | 23,38  | 0,18                | 0,48               | 251,19   | 0,74                | 1,90            | 2               | kein G. | 266              |
| 1062               | Weizen | 2         | 24,69   | 24,19 | 23,32  | 0,20                | 0,22               | 261,61   | 0,77                | 0,85            | 0               | kein G. | 165              |
| 1041               | Weizen | 2         | 25,92   | 23,94 | 24,88  | 0,09                | 0,26               | 90,95    | 0,96                | 2,91            | 0               | kein G. | 138              |
| 62                 | Weizen | 2         | 23,31   | 21,27 | 22,33  | 0,51                | 1,65               | 511,47   | 1,00                | 3,22            | 0               | kein G. | 249              |
| 179                | Weizen | 2         | 23,38   | 23,05 | 22,44  | 0,49                | 0,49               | 474,76   | 1,02                | 1,03            | 0               | kein G. | 272              |
| 1061               | Weizen | 2         | 24,22   | 21,90 | 23,31  | 0,28                | 1,07               | 263,38   | 1,05                | 4,07            | 0               | kein G. | 203              |
| 1039               | Weizen | 2         | 24,75   | 24,04 | 23,98  | 0,19                | 0,25               | 167,31   | 1,15                | 1,48            | 0               | kein G. | 123              |
| 192                | Weizen | 2         | 22,54   | 22,34 | 21,82  | 0,86                | 0,79               | 722,48   | 1,19                | 1,10            | 0               | kein G. | 199              |
| 144                | Weizen | 2         | 23,36   | 22,59 | 22,65  | 0,49                | 0,67               | 411,82   | 1,20                | 1,62            | 0               | kein G. | 252              |
| 1074               | Weizen | 2         | 22,92   | 22,13 | 22,41  | 0,66                | 0,91               | 484,50   | 1,37                | 1,89            | 1               | kein G. | 235              |
| 186                | Weizen | 2         | 23,44   | 22,03 | 22,99  | 0,47                | 0,98               | 327,12   | 1,43                | 2,99            | 0               | kein G. | 238              |
| 1088               | Weizen | 2         | 25,60   | 22,31 | 25,34  | 0,11                | 0,81               | 66,61    | 1,63                | 12,14           | 0               | kein G. | 225              |
| 175                | Weizen | 2         | 22,26   | 22,00 | 22,02  | 1,03                | 1,00               | 630,96   | 1,64                | 1,58            | 0               | kein G. | 273              |
| 197                | Weizen | 2         | 22,34   | 22,00 | 22,12  | 0,98                | 1,00               | 589,64   | 1,66                | 1,70            | 0               | kein G. | 166              |
| 1106               | Weizen | 2         | 25,16   | 24,82 | 25,01  | 0,15                | 0,14               | 83,29    | 1,75                | 1,74            | 1               | kein G. | 295              |
| 139                | Weizen | 2         | 22,37   | 21,36 | 22,35  | 0,96                | 1,55               | 504,59   | 1,90                | 3,07            | 0               | kein G. | 451              |
| 132                | Weizen | 2         | 22,48   | 22,15 | 22,55  | 0,89                | 0,90               | 440,67   | 2,02                | 2,05            | 0               | kein G. | 369              |
| 142                | Weizen | 2         | 23,12   | 22,73 | 23,29  | 0,58                | 0,61               | 266,97   | 2,17                | 2,27            | 1               | kein G. | 307              |
| 95                 | Weizen | 2         | 23,38   | 22,05 | 24,12  | 0,49                | 0,97               | 152,18   | 3,19                | 6,35            | 0               | kein G. | 690              |
| 101                | Weizen | 2         | 22,39   | 21,93 | 23,22  | 0,95                | 1,05               | 279,94   | 3,38                | 3,75            | 0               | kein G. | 1300             |
| 99                 | Weizen | 2         | 21,39   | 21,12 | 22,45  | 1,86                | 1,83               | 471,55   | 3,95                | 3,88            | 0               | kein G. | 1700             |
| 71                 | Weizen | 2         | 21,13   | 20,19 | 22,42  | 2,22                | 3,46               | 481,23   | 4,61                | 7,18            | 1               | kein G. | 500              |

## 8.1 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Aufbereitungsprozess von Zuckerrübensaatgut .....  | 6  |
| <b>Abbildung 2:</b> Schimmelpilzflora auf Getreide.....  | 8  |
| <b>Abbildung 3:</b> DNA-Bindung an eine Silika-Membran .....   | 12 |
| <b>Abbildung 4:</b> Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung von SYBR Green I .....   | 14 |
| <b>Abbildung 5:</b> Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer von Donor auf Akzeptorfluorophor .....   | 15 |
| <b>Abbildung 6:</b> Ablauf einer Real-Time PCR-Reaktion unter Verwendung einer TaqMan™-Sonde<br>und die daraus resultierenden Messkurven.....  | 16 |
| <b>Abbildung 7:</b> Aufbau einer rDNA repeat unit.....   | 21 |
| <b>Abbildung 8:</b> Übersicht aller verwendeten Temperaturprofile für Real-Time PCR-Ansätze.....   | 35 |
| <b>Abbildung 9:</b> Detektionskurven (A) der untersuchten Zuckerrübensorten mit zugehörigen Ct-<br>Werten (C) und Schmelzkurven (B).....   | 44 |
| <b>Abbildung 10:</b> Detektions- und Schmelzkurven der Primertests zur Bestimmung der Spezifität<br>für den Nachweis von <i>Alternaria</i> Spezies, <i>Phoma betae</i> und dem Referenzgen der<br>Zuckerrübe in 3 einzelnen Ansätzen laut Tabelle 9.....   | 46 |
| <b>Abbildung 11:</b> Kontrolle der Referenz-DNA aus der Zuckerrübenpflanzen <i>Cyntia</i> im Real-Time<br>Multiplex PCR-Ansatz .....   | 49 |
| <b>Abbildung 12:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von <i>Phoma betae</i> DNA<br>inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe .....                              | 51 |
| <b>Abbildung 13:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von <i>Alternaria alternata</i><br>DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe.....                      | 52 |
| <b>Abbildung 14:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von Zuckerrüben-DNA<br>inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe .....                                     | 53 |
| <b>Abbildung 15:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von <i>Fusarium</i><br><i>graminearum</i> DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe.....               | 62 |
| <b>Abbildung 16:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe von <i>Fusarium</i><br><i>graminearum</i> DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer zugehörigen Messreihe.....               | 63 |
| <b>Abbildung 17:</b> Bestimmung Regressionsgerade und zugehöriger Regressionskoeffizient aus<br>den Mittelwerten drei separater Messungen einer Verdünnungsreihe aus einer 50:50<br>Mischung von Gersten- und Weizen-DNA inklusive der beispielhaften Darstellung einer<br>zugehörigen Messreihe ..... | 64 |
| <b>Abbildung 18:</b> Detektionskurven 6 verschiedener Master-Mix Zusammensetzungen unter<br>Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an<br>Zuckerrübensaatgut, wobei die Nummerierung der einzelnen Ansätze Tabelle 20 entspricht .....   | 72 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 19:</b> Ct-Wert und Fluoreszenzausbeute 6 verschiedener Master-Mix Zusammensetzungen unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut, wobei die Nummerierung der einzelnen Ansätze Tabelle 20 entspricht .....  | 73  |
| <b>Abbildung 20:</b> Ct-Wert und Fluoreszenzausbeute sowie zugehörige Detektionskurven aus dem Vergleich 3 optimierter Master-Mix-Zusammensetzungen unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut. ....  | 75  |
| <b>Abbildung 21:</b> Detektionskurven und zugehörige Ct-Werte eines optimierten Master-Mix unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut in Bezug auf die Messung einer Verdünnungsreihe bestehend aus <i>Alternaria alternata</i> , <i>Phoma betae</i> und Zuckerrüben-DNA .....  | 77  |
| <b>Abbildung 22:</b> Vergleich von Detektionskurven zweier kommerzieller Real-Time PCR Master-Mixe unter Verwendung des Real-Time PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut .....   | 79  |
| <b>Abbildung 23:</b> Vergleich von Detektionskurven einer TAMRA und einer BODIPY-TMR markierten Sonde bezüglich der Detektion von Zuckerrüben-DNA .....  | 82  |
| <b>Abbildung 24:</b> Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute unter Verwendung von Bindepuffer BP 1; Messung mittels Duplex Real-Time PCR Assay. ....  | 94  |
| <b>Abbildung 25:</b> Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute bei Verwendung von Bindepuffer BP 2, Messung mittels Duplex Real-Time PCR Assay. ....  | 96  |
| <b>Abbildung 26:</b> Vergleich verschiedener Extraktionspuffer bezüglich DNA-Ausbeute und Fluoreszenzausbeute unter Verwendung von Bindepuffer BP 2; Messung mittels Triplex Real-Time PCR Assay. ....   | 97  |
| <b>Abbildung 27:</b> Ct-Werte und Standardabweichungen der Messwerte bei Verwendung von Extraktionspuffer EP 4 und EP 5 mit verschiedenen Spin-Sälchen und Probenmatrizes.....   | 102 |
| <b>Abbildung 28:</b> Relative Standardabweichung der Belastungsindizes in Abhängigkeit von der untersuchten Malzart und der jeweiligen <i>Fusarium</i> -Gruppe .....   | 111 |
| <b>Abbildung 29:</b> Korrelationskoeffizienten der extrahierten DNA-Mengen in Abhängigkeit von der untersuchten Malzart und der jeweiligen <i>Fusarium</i> -Gruppe .....   | 112 |
| <b>Abbildung 30:</b> Einteilung der untersuchten Malzproben in die Kategorien: 1 - Gushing negativ; DON < 111 ppb; 2 - Gushing negativ; DON > 111 ppb; 3 - Gushing positiv; DON < 111 ppb; 4 - Gushing positiv; DON > 111 ppb.....   | 115 |
| <b>Abbildung 31:</b> Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies - Teil 1 von 2 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). ... | 116 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 32:</b> Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies - Teil 2 von 2 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). ... | 117 |
| <b>Abbildung 33:</b> Belastungsindex der untersuchten Gestenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies - Teil 1 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). ... | 118 |
| <b>Abbildung 34:</b> Belastungsindex der untersuchten Gestenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies - Teil 2 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). ... | 119 |
| <b>Abbildung 35:</b> Belastungsindex der untersuchten Gestenmalzproben in Kategorie 1 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies - Teil 3 von 3 -. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). ... | 120 |
| <b>Abbildung 36:</b> Belastungsindex der untersuchten Gestenmalzproben in Kategorie 3 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). .....                | 121 |
| <b>Abbildung 37:</b> Belastungsindex der untersuchten Weizenmalzproben in Kategorie 2 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). .....                | 122 |
| <b>Abbildung 38:</b> Belastungsindex der untersuchten Gestenmalzproben in Kategorie 2 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28). .....                | 123 |
| <b>Abbildung 39:</b> Untersuchung der Gerstenmalzproben der Kategorie 4 mittels Real-Time Multiplex PCR zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies. Die Belastungsindizes der Praxisproben wurden mit der maximal ermittelten, relativen Standardabweichung von 31 % als Abweichung beaufschlagt (vgl. Abbildung 28).....                                | 124 |
| <b>Abbildung 40:</b> Isolierte DNA-Menge der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Gerstenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben.....   | 126 |
| <b>Abbildung 41:</b> Isolierte DNA-Menge der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Weizenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben.....  | 127 |

**Abbildung 42:** Belastungsindex der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Gerstenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben .....128

**Abbildung 43:** Belastungsindex der Gruppe „starke Toxinbildner“ aller Weizenmalzproben im Zusammenhang zum DON-Gehalt der Proben ..... 129

## 8.2 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabelle 1:</b> Von Getreide isolierte <i>Fusarium</i> Spezies und verschiedene von diesen gebildete Toxine .....  | 9  |
| <b>Tabelle 2:</b> Feldbesatz verschiedener <i>Fusarium</i> Spezies an Gerste und Weizen aus verschiedenen Literaturquellen .....   | 23 |
| <b>Tabelle 3:</b> Pipettierschema der PCR zur DNA-Sequenzierung .....  | 34 |
| <b>Tabelle 4:</b> Temperaturprofil der PCR für DNA-Sequenzierungsreaktionen .....  | 34 |
| <b>Tabelle 5:</b> Phytopathogene Pilze als Schädlinge der Zuckerrübe.....  | 38 |
| <b>Tabelle 6:</b> Übersicht Fluoreszenzmarkierung der Sonden des Real-Time Multiplex PCR Assays zum Nachweis von Pathogenen an der Zuckerrübe.....                       | 40 |
| <b>Tabelle 7:</b> Charakteristika des Detektionssystems zum Nachweis von <i>Alternaria</i> Spezies .....   | 41 |
| <b>Tabelle 8:</b> Charakteristika des Detektionssystems zum Nachweis von <i>Phoma betae</i> .....  | 42 |
| <b>Tabelle 9:</b> Versuchsaufbau Test der Real-Time Multiplex PCR Primer mit SYBR Green I .....  | 45 |
| <b>Tabelle 10:</b> Auswertung des Primertests zum Nachweis von <i>Alternaria</i> Spezies - Ansatz 1 - .....  | 47 |
| <b>Tabelle 11:</b> Auswertung des Primertests zum Nachweis von <i>Phoma betae</i> - Ansatz 2 - .....   | 47 |
| <b>Tabelle 12:</b> Auswertung des Primertests zum Nachweis von <i>Alternaria alternata</i> und <i>Phoma betae</i> im Multiplexansatz - Ansatz 3 - .....                  | 48 |
| <b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung Reaktionsansatz Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis von <i>Phoma betae</i> und <i>Alternaria</i> Spezies am Zuckerrübensaatgut ..... | 49 |
| <b>Tabelle 14:</b> Auswertung des Kreuzreaktionstests zum Nachweis von Pathogenen am Zuckerrübensaatgut .....  | 54 |
| <b>Tabelle 15:</b> Mathematische Parameter des Real-Time Multiplex PCR-Systems zum Nachweis von <i>Alternaria</i> Spezies und <i>Phoma betae</i> an der Zuckerrübe ..... | 56 |
| <b>Tabelle 16:</b> Übersicht Fluoreszenzmarkierung der Sonden des Real-Time Multiplex Assays zum Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies an Braugetreide und Braumalz ..... | 59 |
| <b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung Real-Time Multiplex PCR-Reaktionsansatz zum differenzierten Screening von <i>Fusarium</i> Spezies an Gerste und Weizen .....          | 61 |
| <b>Tabelle 18:</b> Auswertung des Kreuzreaktionstests zum Nachweis von Pathogenen an Getreide .....  | 65 |
| <b>Tabelle 19:</b> Mathematische Parameter des Real-Time Multiplex PCR-Systems zum differentiellen Screening von <i>Fusarium</i> Spezies an Gerste und Weizen .....      | 67 |
| <b>Tabelle 20:</b> Chemische Zusammensetzung verschiedener, eigen hergestellter PCR Master-Mixe der Versuchsreihe 1 .....  | 71 |
| <b>Tabelle 21:</b> Chemische Zusammensetzung verschiedener, eigen hergestellter PCR Master-Mixe der Versuchsreihe 2 .....  | 74 |
| <b>Tabelle 22:</b> Für den verwendeten Thermocycler vom Hersteller empfohlene Sondenmarkierung für Triplex Real-Time PCR Assay.....                                      | 81 |
| <b>Tabelle 23:</b> Komponenten der DNA-Isolierung, ihre Einflussfaktoren sowie die Auswirkung auf die DNA-Ausbeute.....  | 84 |
| <b>Tabelle 24:</b> Zusammensetzung der DNA-Extraktionspuffer EP 1 bis EP 8.....  | 86 |
| <b>Tabelle 25:</b> Zusammensetzung der DNA-Bindepuffer BP 1 und BP 2.....  | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabelle 26:</b> Zusammensetzung der Waschpuffer WP 1 und WP 2 zur Aufreinigung der im Spin-Säulchen gebundenen DNA.....  | 89  |
| <b>Tabelle 27:</b> Zusammensetzung des DNA-Elutionspuffers ELT 1.....   | 89  |
| <b>Tabelle 28:</b> Zusammensetzung Reaktionsansatz Real-Time Duplex PCR zum Screening von <i>Fusarium</i> Spezies an Gerste und Weizen.....   | 92  |
| <b>Tabelle 29:</b> Prozentuale Abweichung der Ct-Werte bezogen auf die Verwendung von 5 unterschiedlichen Extraktionspuffern im Vergleich zur Referenzmethode.....  | 99  |
| <b>Tabelle 30:</b> Prozentuale Abweichung der Fluoreszenzausbeute bezogen auf die Verwendung von 5 unterschiedlichen Extraktionspuffern im Vergleich zur Referenzmethode.....   | 99  |
| <b>Tabelle 31:</b> Prozentuale Abweichung der Ct-Werte unter Verwendung von Extraktionspuffer 4 und 5 und Säulchen Typ 1 und 2 bezogen auf den optimalen Wert einer Messreihe.....  | 103 |
| <b>Tabelle 32:</b> Summierte Standardabweichung der Ct-Werte unter Verwendung von Extraktionspuffer 4 und 5 und Säulchen Typ 1 und 2 bezogen auf den optimalen Wert einer Messreihe.....  | 104 |
| <b>Tabelle 33:</b> Untersuchung Gerstenmalz – Probe 1: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen..... | 107 |
| <b>Tabelle 34:</b> Untersuchung Gerstenmalz – Probe 2: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen..... | 108 |
| <b>Tabelle 35:</b> Untersuchung Gerstenmalz – Probe 3: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen..... | 108 |
| <b>Tabelle 36:</b> Untersuchung Weizenmalz – Probe 1: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen.....  | 109 |
| <b>Tabelle 37:</b> Untersuchung Weizenmalz – Probe 2: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen.....  | 109 |
| <b>Tabelle 38:</b> Untersuchung Weizenmalz – Probe 3: Gegenüberstellung der in Dreifachbestimmung gemessenen Ct-Werte, der daraus berechneten DNA-Menge mit zugehörigem Belastungsindex sowie den aus diesen Werten berechneten Mittelwerten, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen.....  | 110 |
| <b>Tabelle 39:</b> Vergleich der beiden Real-Time Multiplex PCR-Systeme zum Nachweis von Pathogenen an Zuckerrübensaatgut und zum Screening und gruppenspezifischen Nachweis von <i>Fusarium</i> Spezies.....   | 135 |

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

|              |   |
|--------------|---|
| abs.         | absolut   |
| ATCC         | American Type Culture Collection                            |
| BHQ          | Black Hole Quencher   |
| BLAST        | Basic Local Alignment Search Tool                           |
| bp           | Basenpaare  |
| BP           | Bindepuffer   |
| BSA          | bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)                  |
| bspw.        | beispielsweise  |
| CBS          | Centraalbureau voor Schimmelcultures                        |
| Ct           | Schwellenwertzyklus (cycle threshold)                       |
| $\Delta R_n$ | normalisiertes Reportersignal                               |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)              |
| dNTP         | 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat                       |
| DSMZ         | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz-Dihydrat            |
| ELISA        | enzyme-linked immunosorbent assay                           |
| ELT          | Elutionspuffer  |
| EP           | Extraktionspuffer   |
| EPA          | U.S. Environmental Protection Agency                        |
| F.           | <i>Fusarium</i>   |
| FAM          | 5,6-Carboxyfluoreszein                                      |
| FRET         | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer                        |
| GÄ           | Genomäquivalente  |
| ggf.         | gegebenenfalls  |
| h            | Stunde(n)   |
| HEX          | 5,6-Carboxy-4,7,2',4',5',7'-hexachlorofluoreszein           |
| Hrsg.        | Herausgeber   |
| ITS          | Internal Transcribed Spacer                                 |
| LMBG         | Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz                  |
| MP           | melting point   |
| n.d.         | not detectable  |
| NCBI         | National Center for Biotechnology Information               |
| NTC          | no template control (PCR-Negativkontrolle)                  |

---

|                |   |
|----------------|---|
| OD             | optische Dichte                                       |
| o.V.           | ohne Verfasser  |
| p              | piko (10 <sup>-12</sup> )                             |
| PCR            | Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| ppb            | parts per billion (z.B. 1 µg/kg)                      |
| ppm            | parts per million (z.B. 1 mg/kg)                      |
| rDNA           | Ribosomale DNA  |
| RM             | Referenzmethode                                       |
| ROX            | 6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin               |
| rpm            | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)       |
| STABW          | Standardabweichung                                    |
| rel. STABW     | relative Standardabweichung                           |
| spp.           | Subspezies  |
| t              | Zeit (time)   |
| T              | Temperatur  |
| TAMRA          | 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin                        |
| <i>Taq</i>     | <i>Thermus aquaticus</i>                              |
| TE-Puffer      | Tris-HCl-EDTA-Puffer                                  |
| Temp.          | Temperatur  |
| T <sub>m</sub> | Schmelzpunkt, Schmelztemperatur                       |
| Tris-HCl       | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid          |
| U              | units   |
| U/min          | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute = rpm) |
| var.           | Varietät  |
| WP             | Waschpuffer   |

## 8.4 Literaturverzeichnis

- Akamatsu, H., (2004):** Molecular biological studies on the pathogenicity of *Alternaria alternata* tomato pathotype, in: Journal of General Plant Pathology, 70, 389.
- Al-Soud, W. A./ Rådström, P., (2001):** Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells, in: Journal of clinical microbiology, 39, 485–493.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, L 00.00-98:** Untersuchung von Lebensmitteln - Qualitativer Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln - Real-time PCR-Verfahren, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).
- ApSimon, J. W., (1994):** The biosynthetic diversity of secondary metabolites, in: Miller, J. D./ Trenholm, H. L., (Hrsg.), Mycotoxins in Grain, St. Paul, 3-18.
- Bakan, B./ Giraud-Delville, C./ Pinson, L./ Richard-Molard, D./ Fournier, E./ Brygoo, Y., (2002):** Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol, in: Applied and Environmental microbiology, 68, 5472–5479.
- Benada, J./ Šedivý, J./ Špaček, J., (1987):** Atlas der Krankheiten und Schädlinge der Rübe, Prag.
- Birzele, B./ Meier, A./ Hindorf, H./ Krämer, J./ Dehne, H.-W., (2002):** Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany, in: European Journal of Plant Pathology, 108, 667–673.
- Bluhm, B. H./ Cousin, M. A./ Woloshuk, C. P., (2004):** Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species, in: Journal of Food Protection, 67, 536-543.
- Boom, R./ Sol, C. J. A./ Salimans, M. M. M./ Jansen, C. L./ Wertheim van Dillen, P. M. E./ van der Noordaa, J., (1990):** Rapid and simple method for purification of nucleic acids, in: Journal of Clinical Microbiology, 28, 495-503.



- Bornscheuer, E./ Meyerholz, K./ Wunderlich, K. H., (1993):** Seed production and quality, in: Cooke D. A./ Scott, R. K., (Hrsg.), *The Sugar Beet Crop*, London, 120-155.
- Bottalico, A., (1998):** *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in: *Journal of Plant Pathology*, 80, 85-103.
- Bottalico, A./ Perrone, G., (2002):** Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals, in: *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–624.
- Brennan, J. M./ Egan, D./ Cooke, B. M./ Doohan, F. M., (2005):** Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*, in: *Plant Pathology*, 54, 156–160.
- Brisson, M./ Hall, S./ Hamby, K./ Park, R./ Srere, H. K., (2004):** Optimization of single and multiplex real-time PCR, in: Bustin, S. A., (Hrsg.), *A-Z of Quantitative PCR*, La Jolla, USA, 621-642.
- Brunner, S./ Adler, A., (2004):** Untersuchung der genetischen Variabilität bei wichtigen *Fusarium*-Arten isoliert von Getreide und Mais aus Österreich, AGES - Forschungsbericht 2004, Projektnummer 21753.
- Bustin, S. A., (2000):** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, in: *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169–193.
- Bustin, S. A., (2002):** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, in: *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.
- Bustin, S. A./ Nolan, T., (2004a):** Primers and Probes, in: Bustin, S. A., (Hrsg.), *A-Z of Quantitative PCR*, La Jolla, USA, 279-328.
- Bustin, S. A./ Nolan, T., (2004b):** The PCR Step, in: Bustin, S. A., (Hrsg.), *A-Z of Quantitative PCR*, La Jolla, USA, 399-438.
- Cakilci, B./ Gunduz, M., (2006):** Clinical microbiology, in: Dorak, M. T., (Hrsg.), *Real-time PCR*, Cornwall, 219-228.

- Carter, M. J./ Milton, I. D., (1993):** An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles, in: *Nucleic Acids Research*, 21, 1.
- Chandler, E. A./ Simpson, D. R./ Thomsett, M. A./ Nicholson, P., (2003):** Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*, in: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 355–367.
- Charmley, L. L./ Rosenberg, A./ Trenholm, H. L., (1994):** Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods, and feedstuffs, in: Miller, J. D./ Trenholm, H. L., (Hrsg.), *Mycotoxins in Grain*, St. Paul, 471-486.
- Chelkowski, J., (1991):** Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest, in: Chelkowski, J., (Hrsg.), *Cereal Grain*, Amsterdam, 53-66.
- Chelkowski, J., (1998):** Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains, in: Sinha, K. K./ Bhatnagar D., (Hrsg.), *Mycotoxins in agriculture and food safety*, Marcel Dekker, NY, 45-64.
- Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union:** Verordnung (EG) Nr. 856/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 06. Juni 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Fusariumtoxine.
- Demeke, T./ Adams, R. P., (1992):** The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR, in: *BioTechniques*, 12, 332–334.
- Desjardins, A. E., (2006):** *Fusarium* mycotoxins, St. Paul.
- Duffus, J. E./ Ruppel, E. G., (1993):** Diseases, in: Cooke D. A., Scott, R. K., (Hrsg.), *The Sugar Beet Crop*, London, 346-427.
- Eckert, K. A./ Kunkel, T. A., (1990):** High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, in: *Nucleic Acids Research*, 18, 3749-3744.

- Ellner, F. M., (2001):** *Fusarium*-Toxine in Getreide – Vorkommen und Vermeidungsstrategien, in: Band 92 der Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Hrsg.): *Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide – Ursachen, Auswirkungen, Vermeidungsstrategien –, 14 – 22.
- Evetts, I. W./ Gill, P. D./ Scranage, J. K./ Weir, B. S., (1996):** Establishing the robustness of short-tandem-repeat statistics for forensic applications, in: *The American Journal of Human Genetics*, 58, 398-407.
- Flannigan, B./ Morton, J. G./ Naylor, A., (1985):** *Fusarium* mycotoxins and the malting of barley, in: Lacey, J./ Wiley, E., (Hrsg.), *Trichothecenes and other Mycotoxins*, New York.
- Frank, A. B., (1892):** Ueber *Phoma betae*, einen neuen parasitischen Pilz, welcher die Zuckerrübe zerstört, in: *Rübenzuckerindustrie*, 42, 904-916.
- Gastl, M./ Zarnkow, M./ Back, W., (2008):** Gushing – ein multikausales Problem!, in: *Brauwelt*, 32, 896-899.
- Goswami, R. S./ Kistler, H. C., (2004):** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops, in: *Molecular Plant Pathology*, 5, 515–525.
- Grace, M. B./ McLeland, C. B./ Gagliardi, S. J./ Smith, J. M./ Jackson III, W. E./ Blakely, W. F., (2003):** Development and assessment of a quantitative reverse transcription-PCR assay for simultaneous measurement of four amplicons, in: *Clinical Chemistry*, 49, 1467–1475.
- Gross-Bellard, M./ Oudet, P./ Chambon, P., (1973):** Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells, in: *European Journal Biochemistry*, 36, 32-38.
- Grothaus, H.-P., (1997):** Einsatz thermischer Verfahren zur Abtötung von *Phoma betae* in Zuckerrübensaatgut unter besonderer Berücksichtigung von Mikrowellenenergie, Dissertationsschrift vorgelegt an der Gerog-August-Universität Göttingen.
- Grunenwald, H., (2003):** Optimization of polymerase chain reactions, in: Bartlett, J. M. S./ Stirling, D., (Hrsg.), *PCR Protocols*, Totowa, 89-99.

- Guarro, J./ Gené, J./ Stchigel, A. M., (1999):** Developments in fungal taxonomy, in: *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 454-500.
- Haikara, A., (1983):** Malt and beer from barley artificially contaminated with *Fusarium* in the field, in: *Proceedings of the 19th EBC Congress*, 401-408.
- Haugland, R./ Vesper, S., (2002):** Method of identifying and quantifying specific fungi and bacteria, Patent No.: US 6,387,652 B1.
- Henke, W./ Herdel, K./ Jung, K./ Schnorr, D./ Loening, S. A., (1997):** Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences, in: *Nucleic Acids Research*, 25, 3957–3958.
- Hernández, M. C./ Sacher, B./ Back, W., (2000):** Untersuchungen zur *Fusarium*-Problematik bei Brauweizen, in: *Brauwelt*, 35, 1385-1392.
- Higuchi, R./ Fockler, C./ Dollinger, G./ Watson, R., (1993):** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, in: *Biotechnology*, 11, 1026–1030.
- 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, in: *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c, 1-8.
- Hippeli, S./ Elstner, E. F., (2008):** Die Rolle von ns-LTP1 und Proteasen bei der Entstehung des primären Gushing, in: *Brauwelt*, 32, 900-904.
- Holland, P. M./ Abramson, R. D./ Watson, R./ Gelfand, D. H., (1991):** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276–7280.
- Homdork, S./ Fehrmann, H./ Beck, R., (2000):** Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain, in: *Journal of Phytopathology*, 148, 7-15.
- Howlett, B. J./ Idnurm, A./ Pedras, M. S. C., (2001):** *Leptosphaeria maculans*, the Causal Agent of Blackleg Disease of Brassicas, in: *Fungal Genetics and Biology*, 33, 1–14.

- Ioos, R./ Assia Belhadj, A./ Menez, M., (2004):** Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002, in: *Mycopathologia*, 158, 351–362.
- Jung, M./ Muche, J. M./ Lukowsky, A./ Jung, K./ Loening, S. A., (2001):** Dimethyl sulfoxide as additive in ready-to-use reaction mixtures for real-time polymerase chain reaction analysis with SYBR Green I dye, in: *Analytical Biochemistry*, 289, 292–295.
- Kainz, P., (2000):** The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations, in: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494, 23-27.
- Kleemola, T./ Nakari-Setälä, T./ Linder, M./ Penttilä, M./ Kotaviita, E./ Olkku, J./ Haikara, A., (2001):** Characterisation and detection of the gushing factors produced by fungi. In: *Proc. E.B.C. 28th Congr., Budapest*. Pp. 1-10. [CD-ROM]. ISBN 90-70143-21-6.
- Kleppe, K./ Ohtsuka, E./ Kleppe, R./ Molineux, I./ Khorana, H. G., (1971)** Studies on polynukleotides. XCVI. Repair of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases, in: *Journal of Molecular Biology*, Vol. 56, Issue 2, S. 341-361.
- Koshinsky, H./ Crosby, R./ Khachatourians, G., (1992):** Effects of T-2 toxin on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, in: *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 16, 275–286.
- Kowalik, M./ Lechowicz, J., (1984):** Mycoflora of sugar beet seeds, in: *Acta Mycologica*, 20, 219-224.
- Kreader, C. A., (1996):** Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4. Gene 32 Protein, in: *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1102–1106.
- Kreuzer, K. A./ Bohn, A./ Lupberger, J./ Solassol, J./ le Coutre, P./ Schmidt, C. A., (2001):** Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye, in: *Clinical Chemistry*, 47, 486–490.
- Kunz, B., (1994):** Grundriß der Lebensmittel-Mikrobiologie, 2. Auflage, Hamburg.

- Lacey, J., (1989):** Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products, in: Supplement to Journal of Applied Bacteriology, 67, 11-25.
- Lee, J. Y., (2004):** Nucleic acid purification: Its principle and miniaturization, MEC seminar, [http://bi.snu.ac.kr/Research/MEC/2004/2004-04-13\(jylee\).ppt](http://bi.snu.ac.kr/Research/MEC/2004/2004-04-13(jylee).ppt), letzter Zugriff: 14.02.2010.
- Lee, L.G./ Connell, C.R./ Bloch, W., (1993):** Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, in: Nucleic Acids Research, 21, 3761–3766.
- Lee, M./ Chang, P./ Shien, J./ Cheng, M./ Shieh, H. K., (2001a):** Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, in: Journal of Virological Methods, 97, 13-32.
- Lee, T./ Oh, D.-W./ Kim, H.-S./ Lee, J./ Kim, Y.-H./ Yun, S.-H./ Lee, Y.-W., (2001b):** Identification of Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae* by Using PCR, in: Applied and Environmental Microbiology, 67, 2966–2972
- Leišová, L./ Kučera, L./ Chrpvová, J./ Sýkorová, S./ Šíp, V./ Ovesná, J., (2006):** Quantification of *Fusarium culmorum* in wheat and barley tissues using real-time PCR in comparison with DON content, in: Journal of Phytopathology, 154, 603–611.
- Li, H.-P./ Wu, A.-B./ Zhao, C.-S./ Scholten, O./ Löffler, H./ Liao, Y.-C., (2005):** Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*, in: FEMS Microbiology Letters, 243, 505-511.
- Lienemann, K., (2002):** Auftreten von *Fusarium*-Arten an Winterweizen im Rheinland und Möglichkeiten der Befallskontrolle unter besonderer Berücksichtigung der Weizensorte, Dissertationsschrift vorgelegt an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Lugert, R./ Schettler, C./ Gross, U., (2006):** Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro, in: Mycoses, 49, 298–304.
- Mackay, I. M./ Arden, K. E./ Nitsche, A., (2002):** Real-time PCR in virology, in: Nucleic Acids Research, 30, 1292–1305.

- Mačkinaitė, R./ Kačergius, A./ Lugauskas, A./ Repečkienė, J., (2006):** Contamination of cereal grain by *Fusarium* micromycetes and their mycotoxins under Lithuanian climatic conditions, in: *Ekologija*, 3, 71–79.
- McCartney, H. A./ Foster, S. J./ Fraaije, B. A./ Ward, E., (2003):** Molecular diagnostics for fungal plant pathogens, in: *Pest Management Science*, 59, 129–142.
- Melzak, K. A./ Sherwood, C. S./ Turner, R. F. B./ Haynes, C. A., (1996):** Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions, in: *Journal of colloid and interface science*, 181, 635-644.
- Mesterházy, Á., (2002):** Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight, in: *European Journal of Plant Pathology*, 108, 675–684.
- Miedaner, T./ Schilling, A. G./ Geiger, H. H., (2001):** Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries, in: *Journal of Phytopathology*, 149, 641-648.
- Miller, J. D., (1994):** Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals, in: Miller, J. D./ Trenholm, H. L., (Hrsg.), *Mycotoxins in Grain*, St. Paul, 19-36.
- Mitchell, J. I./ Roberts, P. J./ Moss, S. T., (1995):** Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy, in: *Mycologist*, 9, 67-75.
- Mohr, A./ Weiher, H./ Herr, I./ Zwacka, R., (2004):** Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in: Wink, M., (Hrsg.), *Molekulare Biotechnologie*, Weinheim, 193-200.
- Mukhopadhyay, A. N., (1987):** Handbook on Diseases of Sugar Beet, Volume I, Florida.
- Mülhard, C., (2003):** Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics, 4. Auflage, Berlin.
- Müller, C., (1995):** Möglichkeiten zur Bewertung des Gesundheitszustandes von Braugerste und Malz, in: *Brauwelt*, 21, 1036-1038, 1051-1054.

- Mullis, K./ Faloona, F./ Scharf, S./ Saiki, R./ Horn, G./ Erlich, H., (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, in: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51, 263-273.
- Nganje, W. E./ Kaitibie, S./ Wilson, W. W./ Leistritz, F. L./ Bangsund, D. A., (2004):** Economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley: 1993-2001, in: Agribusiness and Applied Economics Report No 538, North Dakota State University.
- 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, in: Physiological and Molecular Plant Pathology, 53, 17-37.
- Niessen, L./ Donhauser, S./ Vogel, H., (1991):** Zur Problematik von Mykotoxinen in der Brauerei, in: Brauwelt, 36, 1510-1518.
- Niessen, M. L., (1993):** Entwicklung und Anwendung immunchemischer Verfahren zum Nachweis wichtiger *Fusarium*-Toxine bei der Bierbereitung sowie mykologische Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) von Bieren, Dissertationsschrift vorgelegt an der Technischen Universität München.
- Niessen, M. L., (2001):** DNA-gestützte Diagnose und Taxonomie Mykotoxin bildender Schimmelpilze, Habilitationsschrift vorgelegt an der Technischen Universität München.
- Nirenberg, H. I., (1990):** Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*, in: Studies in Mycology, 32, 91-101.
- o.V., (1996):** 9.2 Modifizierter Carlsberg-Test, in: Pfenninger, H.. (Hrsg.), Brautechnische Analysemethoden – Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysekommision (MEBAK), Band III, 2. Auflage, Freising, 275-276.
- o.V., (2003):** Creating standard curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR, [www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant\\_pcr.pdf](http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf), hrsg. von Applied Biosystems, letzter Zugriff 14.02.2010.
- o.V., (2004a):** QuantiTect® Multiplex PCR Handbook, [www1.qiagen.com/HB/QuantitectMultiplexPCR](http://www1.qiagen.com/HB/QuantitectMultiplexPCR), hrsg. von Qiagen, letzter Zugriff am 14.02.2010.



- o.V., (2004b):** Adding new reporter dyes to the ABI Prims<sup>®</sup> 7900 sequence detection system for use in quantitative, real-time, triplex PCR with the QuantiTect<sup>®</sup> Multiplex PCR Kit, [www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/PCR43.pdf](http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/PCR43.pdf), hrsg. von Qiagen, letzter Zugriff am 14.02.2010.
- o.V., (2002):** PCR- Nachweis der spezifischen gentechnischen Veränderung in Glyphosate-resistenten transgenen Pflanzen, in: Methodensammlung des LAG, hrsg. vom Länderausschuß Gentechnik, <http://www.lag-gentechnik.de/dokumente/soproundup.pdf>, letzter Zugriff am 14.02.2010.
- o.V., (2005):** More about single-molecule FRET, [http://www.phy.syr.edu/courses/PHY615/PHY615\\_L14.ppt#256,1](http://www.phy.syr.edu/courses/PHY615/PHY615_L14.ppt#256,1), letzter Zugriff am 30.12.2007.
- Offenbächer, G., (2001):** Zur Analytik von *Fusarium*-Mykotoxinen, in: Tagungsband der 13. und 14. wissenschaftlichen Fachtagung: *Fusarium*-Befall und Mykotoxinbelastung von Getreide / Schadverdichtung in Ackerböden, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 4-13.
- Parkhurst, K. M./ Parkhurst, L. J., (1995):** Kinetic studies by fluorescence resonance energy transfer employing a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the oligonucleotide complement and to single-stranded DNA, in: *Biochemistry*, 34, 285–292.
- Parry, D. W./ Jenkinson, P./ McLeod, L., (1995):** *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals- a review, in: *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Parry, D. W./ Nicholson, P., (1996):** Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat, in: *Plant Pathology*, 45, 383-391.
- Persson, K./ Hamby, K./ Ugozzoli, L. A., (2005):** Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction - overcoming its limitations, in: *Analytical Biochemistry*, 344, 33–42.
- Peterson, S. W./ Sigler, L., (1998):** Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens, in: *Journal of clinical microbiology*, 36, 2918–2925.

- Pfaffl, M. W., (2004):** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, in: BIoSpektrum, Sonderausgabe PCR, 10, 92-95.
- Ponchel, F., (2006):** Real-time PCR using SYBR green, in: Dorak, M. T., (Hrsg.), Real-time PCR, Cornwall, 139-153.
- Radau, B./ Linemann, A./ Krüger, E., (1995):** Modifizierter Carlsberg-Test, in: Brauerei-Forum, 23, 377-378.
- Rasmussen, R.I., (2001):** Quantification on the LightCycler, in: Meuer, S./ Wittwer, C./ Nakagawara, K., (Hrsg.), Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications, Heidelberg, 21-34.
- Reischera, G. H./ Lemmensb, M./ Farnleitnera, A./ Adlenc, A./ Macha, R. L., (2004):** Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe, in: Journal of Microbiological Methods, 59, 141– 146.
- Rodemann, B., (1999):** Mykotoxine im Getreide, in: Forschungsreport, 20, 6-9.
- Rotem, J., (1994):** The Genus *Alternaria*, St. Paul.
- Rudi, K./ Høidal, H. K./ Katla, T., Johansen, B. K./ Nordal, J./ Jakobsen, K. S., (2004):** Direct Real-Time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification, in: Applied and Environmental Microbiology, 70, 790-797.
- Russell, P. J., (1992):** Genetics, 3. Auflage, New York.
- Saiki, R. K./ Gelfand, D. H./ Stoffel, S./ Scharf, S. J./ Higuchi, R., (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, in: Science, 239, 487-491.
- Salas, B./ Steffenson, B. J./ Casper, H. H./ Tacke, B./ Prom, L. K./ Fetch, T. G. Jr./ Schwarz, P. B., (1999):** *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins, in: Plant Disease, 83, 667-674.

- Sambrook, J./ Fritsch, E. F./ Maniatis, T., (1989):** Molecular Cloning 2, 2. Auflage, New-York.
- Sarlin, T./ Laitila, A./ Pekkarinen, A./ Haikara, A., (2005a):** Effects of three *Fusarium* species on the quality of barley and malt, in: Journal of American Society of Brewing Chemists, 63, 43-49.
- Sarlin, T./ Nakari-Setälä, T./ Linder, M./ Pekkarinen, A./ Haikara, A., (2005b):** Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt, in: Journal of the Institute of Brewing, 111, 105–111.
- Sarlin, T./ Yli-Mattila, T./ Jestoi, M./ Rizzo, A./ Paavanen-Huhtala, S./ Haikara, A., (2006):** Real-time PCR for quantification of toxigenic *Fusarium* species in barley and malt, in: European Journal of Plant Pathology, 114, 371–380.
- Schild, T., (2003):** Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie, [www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman](http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman), letzter Zugriff: 14.02.2010.
- Schnerr, H./ Niessen, L./ Vogel, R. F., (2001):** Real-Time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler-PCR using SYBR<sup>®</sup>Green I for continuous fluorescence monitoring, in: International Journal of Food Microbiology, 71, 53–61.
- 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, in: International Journal of Food Microbiology, 72, 85-89.
- Sen, K./ Fout, G. S./ Haugland, R./ Moulton, C./ Grimm, A./ Di Giovanni, G./ Feige, M. A./ Birkenhauer Best, J./ Lott, G./ Scheller, J./ Reilly, E./ Connell, K./ Marshall, M., (2004):** Quality assurance/Quality control guidance for laboratories performing PCR analyses on environmental samples, [http://www.epa.gov/nerlcwww/qa\\_qc\\_pcr10\\_04.pdf](http://www.epa.gov/nerlcwww/qa_qc_pcr10_04.pdf), letzter Zugriff 14.02.2010.
- Statistisches Bundesamt, (2007):** Statisches Jahrbuch 2007 für die Bundesrepublik Deutschland, Wiesbaden.
- Stephan, C., (2005):** Erfolgsgeschichte Zuckerrüben, in: BDP - Nachrichten November 2005, S. 4.

- Strandberg, J. O. (1992):** *Alternaria* species that attack vegetable crops: Biology and Options for Disease Management, in: Chelkowski, J., Viscont, A., (Hrsg.), *Alternaria*, Volume 3, Amsterdam, 175-208.
- Sugiura, Y./ Fukasaku, K./ Tanaka, T./ Matsui, Y./ Ueno, Y., (1993):** *Fusarium poae* and *Fusarium crookwellense*, fungi responsible for the natural occurrence of nivalenol in Hokkaido, in: Applied and Environmental microbiology, 59, 3334-3338.
- Tanaka, T./ Hasegawa, A./ Yamamoto, S./ Lee, U. S./ Sugiura, Y./ Ueno, Y., (1988):** Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 Countries, in: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36, 979-984.
- Vallone, P./ Orrego, C., (2006):** qPCR – Signals and Probes, qPCR Workshop held at NFSTC, [http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub\\_pres/qPCR\\_Vallone1.pdf](http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/qPCR_Vallone1.pdf), letzter Zugriff am 14.02.2010.
- van Burik, J.-A. H./ Schreckhise, R. W./ White, T. C./ Bowden, R. A./ Myerson, D., (1998):** Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi, in: Medical Mycology, 36, 299-303.
- van der Velden, V. H. J./ Hochhaus, A./ Cazzaniga, G./ Szczepanski, T./ Gabert, J./ van Dongen, J. J. M., (2003):** Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, in: Leukemia, 17, 1013–1034.
- Vogelstein, B./ Gillespie, D., (1979):** Preparative and analytical purification of DNA from Agarose, in: Proceedings of the National Academy of Sciences, 76, 615-619.
- Walker, G. M./ White, N. A., (2005):** Introduction to fungal physiology, in: Kavanagh, K. (Hrsg.), Fungi, West Sussex, 1-34
- Weideneder, A., (1992):** Untersuchungen zum malzverusachten Wildwerden (Gushing) des Bieres, Dissertationsschrift vorgelegt an der Technischen Universität München.

- Weiland, J. J./ Sundsbak, J. L., (2000):** Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gen, in: *Plant Disease*, 84, 475-482.
- Whiley, D. M./ Sloots, T. P., (2006):** Clinical virology, in: Dorak, M. T., (Hrsg.), *Real-time PCR*, Cornwall, 231-243.
- Wolf, P. F. J./ Verreet, J.-A., (1999):** Untersuchungen zur Epidemiologie und Schadrelevanz der Rhizoctonia-Rübenfäule (*Rhizoctonia solani* Kühn), in: *Gesunde Pflanzen*, 51, 133-140.
- Wolfe, K. A./ Breadmore, M. C./ Ferrance, J. P./ Power, M. E./ Conroy, J. F./ Norris, P. M./ Landers, J. P., (2002):** Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids, in: *Electrophoresis*, 23, 727–733.
- Woron, A. M./ Nazarian, E. J./ Egan, C./ McDonough, K. A./ Cirino, N. M./ Limberger, R. J./ Musser, K. A., (2006):** Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis*, in: *Diagnostic Microbiology and Infectious*, 56, 261-268.
- Wu, W./ Brand, L., (1994):** Resonance Energy Transfer: Methods and Applications, in: *Analytical Biochemistry*, 218, 1-13.
- Yamada, Y./ Makimura, K./ Merhendi, H./ Ueda, K./ Nishiyama, Y./ Yamaguchi, H./ Osumi, M., (2002):** Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts, in: *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 55, 122-125.
- Yu, S.-H., (1992):** Occurrence of *Alternaria* species in countries of the far east and their taxonomy, in: Chelkowski, J./ Viscont, A., (Hrsg.), *Alternaria*, Volume 3, Amsterdam, 37-62.
- Yuen, C., (2006):** Isolation and quantification of nucleic acids in plants, <http://abe.leeward.hawaii.edu/WebSharing/Nucleic%20Acid%20Isolation.ppt>, letzter Zugriff am 14.02.2010.

- Zapf, M. W., (2006):** Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. und deren Einfluss auf die Blasenstabilisierung in Bier, Dissertationsschrift vorgelegt an der Technischen Universität München.
- Zhang, N./ O'Donnell, K./ Sutton, D. A./ Nalim, F. A./ Summerbell, R.C./ Padhye, A. A./ Geiser, D. M., (2006):** Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment, in: Journal of Clinical Microbiology, 44, 2186-2190
- Ziegler, K., (2006):** Hackfruchtanbau, Beta-Rüben: Zucker- und Futterrüben, in: Munzert, M., Frahm, J., (Hrsg.), Pflanzliche Erzeugung, München, 590-641.
- Zur, G./ Hallerman, E. M./ Sharf, R./ Kashi, Y., (1999):** Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Alternaria* fungal contamination in food products, in: Food Products in Journal of Food Protection, 62, 1191-1197.
- Zur, G./ Shimoni, E./ Hallerman, E. M./ Kashi, Y., (2002):** Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay, in: Journal of Food Protection, 65, 1433-1440.