Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

BÖLN
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft

Schlussbericht zum Thema

Quantitativer und qualitativer Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia spp., Ustilago nuda*) bei Weizen und Gerste mittels biotechnologischer Methoden (q-PCR, LAMP-Technologie)

FKZ: 2812NA017; 2812NA128

Projektnehmer: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft; Julius Kühn-Institut

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖLN-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter
www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boeln@ble.de

Schlussbericht

Quantitativer und qualitativer Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) bei Weizen und Gerste mittels biotechnologischer Methoden (qPCR, LAMP-Technologie)

Teilprojekt LfL

Entwicklung von quantitativen und qualitativen Nachweismethoden für Brandkrankheiten (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) bei Weizen und Gerste mittels qPCR

Teilprojekt JKI

Entwicklung von LAMP-basierten Schnelltests für den Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) und Untersuchungen zur Populationsstruktur von *Tilletia caries* und *T. controversa*

Zuwendungsempfänger

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
AG Saatgutuntersuchung & Saatgutforschung
Lange Point 6, Labor 2
85354 Freising

Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik
Messeweg 11-12
38104 Braunschweig

Förderkennzeichen (FKZ): 2812NA017 (LfL)
2812NA128 (JKI)

Laufzeit: 01.10.2014 - 31.12.2019

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

BÖLN
Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Am Projekt beteiligte Kooperationspartner

apl. Prof. Dr. rer. nat. habil. Ludwig Niessen
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Gregor-Mendel-Straße 4
85354 Freising
Tel.: +49 8161 / 71 5496
Fax: +49 8161 / 71 3327
Email: ludwig.niessen@lrz.tu-muenchen.de

Prof. Dr. Marco Thines
Institut für Ökologie, Evolution und Diversität/Biodiversität und Klima
Forschungszentrum
Senckenberganlage 25
60325 Frankfurt am Main
Tel: +49 (0)69 7542 1851
E-Mail: thines@bio.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. Eva Zyprian
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
76833 Siebeldingen
Tel: +49 (0)6345 41 126
Fax: +49 (0)6345 41 179
eva.zyprian@julius-kuehn.de

Kontaktinformationen

Name: Berta Killermann, Wolfgang Maier

Email: berta.killermann@LfL.bayern.de
wolfgang.maier@julius-kuehn.de

Adresse: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
Arbeitsgruppe Saatgutuntersuchung & Saatgutforschung
Lange Point 6, Labor 2
85354 Freising

Julius Kühn-institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik
Messeweg 11-12
38104 Braunschweig

Kurzfassung

„Quantitativer und qualitativer Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia spp., Ustilago nuda*) bei Weizen und Gerste mittels biotechnologischer Methoden (qPCR, LAMP-Technologie)“

Forster MK[1*], Sedaghatjoo S[2*], Maier W[2], Killermann B[1]

[1] Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Lange Point 6, 85354 Freising, berta.killermann@lfl.bayern.de

[2] Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, wolfgang.maier@julius-kuehn.de

*Gemeinsame Erstautoren

Der Steinbrand des Weizens wird verursacht durch *Tilletia caries* und *T. laevis,* der Zwergsteinbrand durch *T. controversa*. Derzeit werden diese Pathogene mittels einer Filtrationsmethode mit anschließender Mikroskopie und Auszählung der Sporen nachgewiesen. Diese Methode ist jedoch sehr zeitaufwändig und die Artbestimmung oft schwierig. Deshalb wurden im Projekt effiziente molekularbiologische Methoden (qPCR und LAMP) entwickelt. Für die Entwicklung dieser Tests wurden 11 Gesamtgenome der drei sehr nah verwandten Arten sequenziert. Durch die gemeinsame bioinformatische Analyse dieser und 10 weiterer vor kurzem veröffentlichter Genome konnten Loci identifiziert werden, die für *T. controversa* beziehungsweise *T. caries/T. laevis* spezifisch sind. Daraufhin wurden Primer und Protokolle für den spezifischen Nachweis von *T. controversa* entwickelt und an über 200 Isolaten der drei Arten sowie weiterer pilzlicher Pflanzenpathogene getestet. Beide Methoden waren sehr robust bezüglich ihrer Spezifität und es wurden Vergleichsuntersuchungen in anderen Laboren durchgeführt. Bei der LAMP-Methode erfolgte der qualitative Nachweis über einen Farbumschlag in der Reaktionslösung. Mit der Sonden-basierten qPCR-Methode wurde *T. controversa* qualitativ und quantitativ an Weizenkörnern nachgewiesen. Die Methode wurde zudem erfolgreich an Saatgutproben aus der regulären Saatgutuntersuchung überprüft. Die untere Nachweisgrenze des Tests beträgt rechnerisch, bei Analyse von Triplikaten, 0,92 Sporen pro Korn. Die vergleichenden Genomuntersuchungen zeigten eine außergewöhnlich große genetische Übereinstimmung zwischen den drei Arten, insbesondere zwischen *T. caries* und *T. laevis*. Basierend auf diesen Daten konnten 41 Mikrosatellitenmarker für populationsgenetische Untersuchungen entwickelt werden. Diese Untersuchungen zeigten unter anderem auf, dass *T. controversa*-Isolate von Weizen und Isolate von Wildgräsern distinkte Populationen sind. Somit spielen Wildgräser wahrscheinlich keine Rolle als Wirts-Reservoir von *T. controversa* für die Infektion von Weizen.

Abstract

"Quantitative and qualitative detection of wheat and barley bunt diseases (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) by means of biotechnological methods (qPCR, LAMP-technology)"

Forster MK[1*], Sedaghatjoo S[2*], Maier W[2], Killermann B[1]

[1] Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Lange Point 6, 85354 Freising, berta.killermann@lfl.bayern.de

[2] Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, wolfgang.maier@julius-kuehn.de

* Joint first authors

Common bunt of wheat is caused by *Tilletia caries* and *T. laevis*, dwarf bunt is caused by *T. controversa*. Currently, these pathogens are detected using a filtration method, which comprises microscopic identification and counting of spores. However, the method is very tedious and species identification is often challenging. Therefore, the project aims were to develop efficient molecular biological methods (qPCR and LAMP). Thus, 11 whole genomes of the three very closely related species were sequenced to develop these tests. These genomes were then analysed together with 10 recently published genomes using bioinformatic tools enabling the detection of suitable genome regions to develop markers for *T. controversa* and *T. caries/T. laevis*, respectively. Using these markers specific primers and assays were developed for the specific detection of *T. controversa* and tested by using more than 200 isolates representing the three bunt species and further fungal plant pathogens. Both the developed qPCR and LAMP were highly specific and test performance studies involving several labs were conducted. For the LAMP-assay a qualitative colorimetric end point detection of the pathogen was implemented. Using the probe-based qPCR *T. controversa* could be detected qualitatively and quantitatively on wheat seed. The method was also successfully tested using seed samples from the routine seed testing. The limit of detection of the assay was calculated at 0.92 spores per kernel if triplicates were analysed. The comparative genomic analyses revealed a remarkably high genetic identity of the three species, especially for *T. caries* and *T. laevis*. Using this data 41 microsatellites could be developed for biological population studies. These studies showed that *T. controversa* isolates from wheat and isolates of wild grasses belong to distinct populations. Thus, wild grasses most likely do not play a role as host reservoir of *T. controversa* for the infection of wheat.

Inhaltsverzeichnis

Zuwendungsempfänger 1

Titel des Forschungsvorhabens ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Teilprojekt LfL 1

Teilprojekt JKI 1

Förderkennzeichen (FKZ): 1

Laufzeit: 1

Kontaktinformationen 2

Am Projekt beteiligte Kooperationspartner 2

Kurzfassung 3

Abstract 4

Abkürzungsverzeichnis 7

Tabellenverzeichnis 8

Abbildungsverzeichnis 8

1 Einführung 9

1.1 Gegenstand 9

1.2 Ziele des Vorhabens 10

1.3 Planung und Ablauf des Projektes 11

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde 11

3 Material und Methoden 13

3.1 Vergleichsprobensammlung und Bestimmung der Tilletia-Akzessionen (LfL / JKI) 13

3.2 Genomsequenzierung und -analyse (JKI) 14

3.3 Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern und Populationsstudien an *T. caries*, *T. laevis* und *T. controversa* (JKI) 15

3.4 Detektion spezifischer Genomregionen durch vergleichende Genomanalysen für die Entwicklung von Markern zum Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR und LAMP (JKI) 15

3.5 Testentwicklung 16

3.5.1 Entwicklung eines LAMP-Tests zum Nachweis von *T. controversa* (JKI) 16

3.5.2 Eignungsprüfung des LAMP-Nachweises von *T. controversa* – Evaluierung der Robustheit der Methode in anderen Laboren (JKI) 17

3.5.3 Entwicklung einer qPCR-Methode zum Nachweis von *T. controversa* (LfL) 18

3.5.4 Eignungstest des qPCR-Nachweises von *T. controversa* – Überprüfung der Robustheit der Methode in anderen Laboren 21

3.5.5 Analyse von Routineproben mittels qPCR-Nachweis 22
4 Ergebnisse und Diskussion 22
4.1 Identifikation der *Tilletia*-Akzessionen 22
4.2 Gesamtgenomsequenzierung und Genomvergleiche 23
4.3 Entwicklung von Mikrosatelliten und Implikationen der Mikrosatellitenanalysen für die Populationsstruktur der untersuchten *Tilletia*-Isolate 27
4.4 Detektion geeigneter Genomregionen für die spezifische Primer-Entwicklung für qPCR und LAMP 29
4.5 Entwicklung und Überprüfung der Nachweismethoden im Labor 29
4.5.1 Nachweis von *T. controversa* mittels LAMP 29
4.5.2 Eignungstest für den LAMP-Nachweis von *T. controversa* zum Überprüfen der Robustheit in anderen Laboren 31
4.5.3 Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR 32
4.5.4 Eignungstest für den qPCR-Nachweis von *T. controversa* zum Überprüfen der Robustheit in anderen Laboren 36
4.5.5 Praktische Anwendung der qPCR-Methode an Routineproben 39
5 Diskussion (siehe 4.) 41
6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 41
7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen 43
8 Zusammenfassung 46
9 Literaturverzeichnis 47
10 Übersicht aller im Berichtszeitraum realisierter Veröffentlichungen 51
Anhang 54

Abkürzungsverzeichnis

ANI: Durchschnittliche Nukleotid-Identität (Average Nucleotide Identity)

Cq-Wert: Schwellenwert Zyklus (Quantification Cycle)

CTAB: Cetyltrimethylammoniumbromid

ddPCR: Digitale PCR (droplet digital PCR)

DNA: Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

EPPO: Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum

gDNA: genomische DNA

Indel: Insertion/Deletion

IPC: Plattenübergreifender Kalibrator (interplate calibrator)

ISTA: Internationale Vereinigung für Saatgutprüfung (International Seed Testing Association)

LAMP: Schleifenvermittelte isothermale Amplifikation (loop-mediated isothermal amplification)

LOD: Untere Nachweisgrenze (Limit of Detection)

LOQ: Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification)

MPN: Wahrscheinlichste Anzahl (most probable number)

NaClO: Natriumhypochlorid

NPC: Kontrolle zum Ausschluss von Verunreinigungen während des Prozesses (negative process control)

NTC: Negativkontrolle, ohne Zugabe von DNA (no template control)

N50: Contigs decken ≥ 50 % des Genoms ab

PacBio: Pacific Bioscience – Hersteller eines Sequenzierautomaten

qPCR: Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (real-time quantitative PCR)

S/K: Sporen pro Korn

SMRT: Einzelmolekül Echtzeit- Sequenziermethode (Single-Molecule Real-Time Sequencing)

SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)

TE: Transponierbares (DNA-)Element (Transposable element)

TE-Puffer: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Ethylendiamintetraessigsäure (Tris-EDTA-Puffer)

VDLUFA: Verband Deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Informationen zu den für die Genomsequenzierungen verwendeten Pilzisolate..... 14
Tabelle 2. Berechnung der Test-Eigenschaften anhand der Anzahl der Proben die richtig positiv (RP), richtig negativ (RN), falsch positiv (FP) oder falsch negativ (FN) sind 18
Tabelle 3. Genomstatistik der *Tilletia*-Isolate..... 24
Tabelle 4. Anzahl von Genen die einzigartig für eine Art sind und in allen Isolaten dieser Art vorkommen 27
Tabelle 5. Test-Eigenschaften und Testgenauigkeit des neu entwickelten qPCR Tests zum Nachweis von Teliosporen von *T. controversa*. Referenzproben N=107, inklusive Testproben N=224 32
Tabelle 6 Ermittlung der initialen Sporenzahl mittels MPN (most probable number) PCR. 33
Tabelle 7. Quantitäten der Plasmid-DNA Standards zum quantitativen Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR 34
Tabelle 8. Gruppierung der 64 untersuchten Routineproben bezogen auf ihre Abweichung der ermittelten Sporenzahl mittels qPCR-Methode im Vergleich zur Filtrationsmethode in Prozent..... 39
Tabelle 9. Bewertung der mittels qPCR- und Filtrationsmethode ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der in Deutschland geltenden Grenzwerte von 20 und 100 S/K (N=64) 40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Ablaufschema der Primerentwicklung und -testung..... 17
Abbildung 2. Ablaufschema der Arbeitsschritte zum Nachweis von *T. controversa* an Weizen..... 18
Abbildung 3. Ähnlichkeiten zwischen den Genomen von *Tilletia* spp. 21 Genome von 6 *Tilletia* spp. wurden mittels PYANI bestimmt und für die Konstruktion eines einfachen Verknüpfungs-Dendrogramms verwendet, das auf der linken Seite gezeigt wird.. 25
Abbildung 4. Verteilung der Orthocluster von 16 Isolaten von *T. caries*, *T. laevis,* und *T. controversa*. 26
Abbildung 5. Clusteranalyse von 41 Mikrosatelliten-Loci mittels der Neighbor-Joining-Methode 28
Abbildung 6. Kolorimetrischer Nachweis von *T. controversa* mit Neutralrot unter Tageslichtbedingungen. 30
Abbildung 7. Bildnachweis der Ergebnisse des Eignungstests zum Nachweis von *T. controversa* mittels des entwickelten LAMP-Tests. A. Referenzfoto des Testausrichters (JKI) 31
Abbildung 8. Nachweis von *T. controversa* Sporen-DNA mittels spezifischer qPCR 35
Abbildung 9. qPCR-Analyse von Testproben mit neu entwickelter Nachweismethode..... 36
Abbildung 10. qPCR-Analyse von Testproben mit der neu entwickelten Nachweismethode in sieben verschiedenen, unabhängigen Laboren (Eignungstest)..... 37
Abbildung 11. Vergleich der Ergebnisse der ersten qPCR-Analyse des Eignungstests (Lab F-1) mit der zweiten qPCR-Analyse nach Optimierung der Methode (Lab F-2) anhand der identischen Testproben... 38

1 Einführung

1.1 Gegenstand

Steinbrand und Zwergsteinbrand sind zwei Pilzkrankheiten, die die Produktion von Weizen (*Triticum aestivum*) weltweit stark beeinträchtigen können. Verursacht wird der Steinbrand des Weizens durch *Tilletia caries* und *T. laevis*, wohingegen *T. controversa* der Erreger des Zwergsteinbrandes ist. Anstelle von Körnern bilden sich sogenannte Brandbutten, die Millionen Sporen enthalten, welche unangenehm nach Heringslake (Trimethylamin) riechen. Spätestens bei der Ernte brechen die Brandbutten auf und die klebrigen Sporen haften an den Getreidekörnern an. Infiziertes Erntegut mit einer hohen Sporenbelastung kann weder als Nahrungsmittel noch als Futtermittel verwendet werden. In den letzten Jahren traten die beiden Krankheiten wieder verstärkt auf, insbesondere im ökologischen Landbau, wo der Einsatz chemischer Saatgutbehandlungsmittel nicht erlaubt ist (Matanguihan et al., 2011). Für die drei Krankheitserreger gilt in Deutschland sowohl für konventionell als auch ökologisch erzeugtes Saatgut der Schwellenwert von 20 Sporen pro Korn (S/K). Saatgut mit einem höheren Sporenbesatz (bis maximal 100 S/K) darf nur mit entsprechenden Auflagen (chemische Beizung, oder geeignete Saatgutbehandlung wie z.B. Bürsten) in Verkehr gebracht werden. In anderen Ländern gelten für die *Tilletia*-Arten unterschiedlich hohe Schwellenwerte bis hin zur Einstufung des Zwergsteinbrandes als Quarantäneschädling mit Nulltoleranz. Für den internationalen Saatgutverkehr ist es daher unabdingbar die Erreger der beiden Pilzkrankheiten sicher und schnell nachweisen und voneinander unterscheiden zu können.

Tilletia caries, T. laevis und *T. controversa* unterscheiden sich in morphologischen und physiologischen bzw. infektionsbiologischen Merkmalen. Während *T. caries* und der in Deutschland seltenere aber in Nordamerika weit verbreitete *T. laevis* ätiologisch völlig identisch zu sein scheinen, also die gleiche Infektionsbiologie aufweisen und gleiche Symptome verursachen unterscheiden sie sich relativ deutlich in ihrer Morphologie der Sporenoberfläche. Im Falle von *T. laevis* ist diese glatt, wohingegen *T. caries* netzartige Leisten von ca. 0,5 – 1,5 µm aufweist. Diese Ornamente sind wiederum bei *T. controversa* mit ca. 1,5 – 3,0 µm Leistenhöhe stärker ausgeprägt als bei *T. caries*. Bei Anwendung der optimierten Filtrationsmethode mit nachfolgender Mikroskopie dient diese Variation in der Ausprägung der Leistenstrukturen als Unterscheidungskriterium. Die Größe der Teliosporen (Brandsporen) kann hingegen kaum für die Artdifferenzierung genutzt werden, da die Sporendurchmesser der drei Arten sehr stark variieren und überlappen (Vánky, 2012). Physiologisch bzw. infektionsbiologisch unterscheiden sich die Arten folgendermaßen: Die Verursacher des gewöhnlichen Steinbrands (*T. caries, T. laevis*) keimen bei 14 – 16 °C, wobei die Keimung der Teliosporen innerhalb von vier bis fünf Tagen erfolgt (Lowther, 1950). Im Gegensatz dazu keimt der Verursacher des Zwergsteinbrandes (*T. controversa*) bei niederen Temperaturen von 0 – 5 °C und die Keimungsdauer der Teliosporen beträgt vier bis sechs Wochen (Meiners and Waldher, 1959). Er befällt deshalb auch überwiegend Winterweizen (bzw. Wintergetreide), da die Infektion während der Bestockung bei nichtgefrorenem Boden, unter einer geschlossenen Schneedecke bei Streulicht, optimal erfolgt. Der gewöhnliche Steinbrand hingegen infiziert sowohl Winter- als auch Sommergetreide während des Auflaufens im Herbst oder Frühjahr (Purdy et al., 1963).

Zudem ist das Vorhandensein von Licht für die Keimung von *T. caries* und *T. laevis* Sporen nicht erforderlich (Goates, 1996).

Die Identifizierung und Quantifizierung der Krankheitserreger in Saatgutproben erfolgt derzeit anhand der sogenannten optimierten Filtrationsmethode (Schumann et al., 2016). Das Vorhandensein von Mischinfektionen und intermediärer Typen der Brandsporen, sowie eine veränderte Lichtbrechung aufgrund des Filterpapiers und eine damit einhergehende reduzierte Auflösung bei Betrachtung der Teliosporen mittels Lichtmikroskopie erschweren oftmals die eindeutige Artzuordnungen der Erreger. Der qualitative und quantitative Sporennachweis ist bei stark infizierten und verschmutzten Saatgutproben zudem sehr mühsam. Die Filtrationsmethode ist dabei sehr zeitaufwändig und erfordert langjährige Erfahrung sowie eine regelmäßige Schulung der Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen in der Saatgutanalyse.

1.2 Ziele des Vorhabens

Die zu Projektbeginn genannten Ziele sind hier noch einmal kurz aus dem ursprünglichen Antrag zusammengefasst.

In der Praxis existieren zwei Hauptprobleme:

(1.) Die Unterscheidung der Sporen und damit die Bestimmung der verschiedenen Arten der Brandkrankheiten, insbesondere bei Mischinfektionen, ist nur mit langjähriger Erfahrung einigermaßen sicher möglich.

(2.) Die Ermittlung der Befallsstärke (Anzahl der Sporen pro Korn = S/K) erfolgt über eine Hochrechnung, wobei die Genauigkeit von der Größe der Stichprobe abhängig ist.

Im hier beschriebenen Projekt sollen mittels quantitativer PCR (qPCR) und LAMP-Technologie robuste, schnelle, reproduzierbare und kosteneffiziente Nachweismethoden, sog. “Prototypen“ entwickelt werden. Langfristig sollen die entwickelten Methoden für die Identifizierung und die qPCR-Methode zusätzlich zur Quantifizierung der Tilletia-Sporen in Saatgutproben, nach entsprechenden Validierungsstudien, in das ISTA Methodenbuch aufgenommen und damit die bisher verwendeten, nicht validierten Methoden ersetzt werden.

Ein weiteres Ziel des Projektes ist es mit Hilfe von Mikrosatelliten Populationsstudien an *T. caries* und *T. controversa* durchzuführen, um physiologische Rassen nachweisen und unterscheiden zu können. Diese Untersuchungen können wichtige allgemeine Erkenntnisse zur Populationsstruktur, Rassen- oder Hybridbildung bei den verschiedenen *Tilletia*-Arten liefern, die zudem bei der Resistenzzüchtung von Weizen, insbesondere für den ökologischen Landbau, von großer Bedeutung sind.

Die übergeordneten Ziele des Projektes wurden entsprechend der folgenden Aufteilung von den beiden Projektpartnern bearbeitet:

LfL:
Entwicklung von quantitativen und qualitativen Nachweismethoden für Brandkrankheiten (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) bei Weizen und Gerste mittels qPCR

JKI:
Entwicklung von LAMP-basierten Schnelltests für den Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp., *Ustilago nuda*) und Untersuchungen zur Populationsstruktur von *Tilletia caries* und *T. controversa*

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

- Allgemeine Projektplanung und Projektantrag durch die Projektleitungen
- Einstellung der wissenschaftlichen Projektbearbeiterinnen, Kick-off-meeting und spezifische Planung der Umsetzung der Projektziele
- Zur Überprüfung der Spezifität der entwickelten Marker wurde eine möglichst große Anzahl an Isolaten aus den verschiedensten geographischen Regionen benötigt. Dafür wurde Kontakt zu *Tilletia*-Spezialistinnen und Spezialisten im In- und Ausland aufgenommen, insbesondere auch zu Saatgutlaboren im VDLUFA (Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), Öko-Züchtern, Pflanzenschutzämtern, ISTA-Mitgliedslaboren, sowie zu Beratern der Öko-Verbände. Insgesamt wurden weltweit 268 *Tilletia*-Proben gesammelt, die in die Untersuchungen eingeflossen sind (vgl. Tabelle A1).
- Aufgrund von nicht erwarteten Schwierigkeiten in der Testentwicklung mussten Schwerpunkte und die methodische Herangehensweise nach intensiver fachlicher Diskussion der Kooperationspartner geändert werden, um die Projektziele zu erreichen. Der Schwerpunkt wurde ganz auf die Entwicklung der Nachweismethoden für die *Tilletia-Arten* bei Weizen gelegt. Die Entwicklung einer Nachweismethode für den Gerstenflugbrand (*Ustilago nuda*) wurde daher nicht weiterverfolgt. Auch *T. indica* wurde nicht weiterbearbeitet, da im Projektverlauf bekannt wurde, dass sich bereits andere internationale Forschungsgruppen eingehend mit dieser *Tilletia*-Art auseinandersetzen.
- Im Projekt-Verlauf wurden alternierend an der LfL bzw. am JKI jeweils halbjährlich zweitägige Projekttreffen durchgeführt, um die erzielten Projektfortschritte vorzustellen, aufgetretene Probleme und Lösungsmöglichkeiten zu diskutieren und die nächsten Schritte zu planen.
- Zusätzlich zu den Projekttreffen gab es zwischen den zwei Wissenschaftlerinnen, die die jeweiligen Teilprojekte bearbeiteten, und den Projektleitern regelmäßige Telefon- und E-Mail-Kontakte zu tagesaktuellen Problemen bzw. Aufgaben.
- Es fand ein kontinuierlicher Know-how-Austausch mit den amtlichen Saatgutlaboren auf den jährlich stattfindenden VDLUFA-Kongressen statt. Des Weiteren wurden die Fortschritte des Projektes mittels Präsentationen und Diskussionen der Ergebnisse auf dem ISTA Kongress 2016, dem Internationalen Workshop zu Brandpilzen 2018 und der Pflanzenschutztagung 2018, vorgestellt. Als ISTA akkreditiertes Saatgutlabor ist die LfL unter anderem auch in kontinuierlichem Kontakt und Austausch mit dem Technischen Komitee für Gesundheitsprüfung der ISTA.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

Der qualitative und quantitative Nachweis der Brandsporen erfolgt in den meisten Saatgutlaboren derzeit anhand einer im ISTA Working Sheet No 53 beschriebenen, nicht validierten Methode, wobei die

Filtrationsmethode im Gegensatz zur Hämozytometermethode häufiger zum Einsatz kommt. In Laborvergleichsuntersuchungen zwischen den *Tilletia*-Testlaboren in Deutschland wurde mit der Filtrationsmethode mitunter eine große Streuung der Ergebnisse bezüglich der Quantifizierung der Sporenbelastung pro Korn festgestellt. Auf Grund dessen hatte der „Arbeitskreis Diagnose / Unterarbeitskreis Mykologie“ der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft (DPG) und die Fachgruppe Saatgut im VDLUFA gemeinsam die Filtrationsmethode nach dem ISTA Working Sheet No 53 optimiert und die Reproduzierbarkeit der damit ermittelten Ergebnisse im Rahmen eines Ringversuches überprüft. Dies erfolgte annähernd parallel zum Start des hier beschriebenen Forschungsprojektes. Unsere Arbeitsgruppen waren als Teilnehmer der Vergleichsuntersuchung (LfL) bzw. als Organisator (JKI) maßgeblich beteiligt. Im Gegensatz zu den vorherigen Laborvergleichsstudien waren die Quantifizierungsergebnisse mit der optimierten Filtrationsmethode zwischen den Laboren sehr homogen und statistisch abgesichert. Diese „optimierte Filtrationsmethode“ wurde in die Beschlusssammlung der Fachgruppe Saatgut aufgenommen (Schumann et al. 2016) und ist damit für die Untersuchung in den amtlichen deutschen Saatgutlaboren vorgeschrieben. Somit waren gute Voraussetzungen geschaffen, um diese nun quantitativ relativ robuste Methode als Referenz für die im Rahmen dieses Projektes neu zu entwickelnden molekularen Methoden zu verwenden. Die Herausforderungen und Schwierigkeiten bei der eindeutigen Artbestimmung als *T. controversa* oder *T. caries* blieben aber weiterhin bestehen.

In den letzten Jahren haben sich mehrere Studien mit dem Nachweis der *Tilletia*-Pathogene mittels verschiedener DNA-basierter Nachweismethoden befasst. Einige der entwickelten Marker waren als unspezifische Marker konzipiert, die nicht dazu gedacht waren, zwischen Steinbrand und Zwergsteinbrand zu unterscheiden (Josefsen and Christiansen, 2002; Kochanova et al., 2004; Mulholland and McEwan, 2000; Pieczul et al., 2018; Zouhar et al., 2010). Da Saatgut international gehandelt wird und hierbei für *T. caries*, *T. laevis* und *T. controversa* in einigen Ländern spezifische Einfuhrbedingungen gelten, ist die genaue Unterscheidung der Arten zwingend erforderlich. Andere DNA-basierte Methoden, die zum spezifischen Nachweis von *T. controversa* bestimmt waren, wurden nur an einer sehr begrenzten Anzahl von Proben getestet (Gao et al., 2011; Gao et al., 2015; Liu et al., 2009; Zgraja et al., 2016). Bei Überprüfung dieser Tests an einer größeren Anzahl an Proben kam es zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Keines dieser publizierten Protokolle konnte in unseren Tests zu Projektbeginn robuste Ergebnisse liefern. Das Problem bestand darin, dass sie überwiegend auf Genregionen aufgebaut waren, die routinemäßig für Verwandtschaftsstudien und Stammbaumrekonstruktionen von Pilzen verwendet werden. Frühere Studien hatten aber bereits gezeigt, dass es den für solche phylogenetische Studien routinemäßig verwendeten DNA-Regionen im Falle von *T.* caries, *T. laevis,* und *T. controversa* an Polymorphismen mangelt (Carris et al., 2007) und die drei Arten anhand dieser nicht differenziert werden können. Es wurden deshalb neue, andere DNA-Regionen für die Entwicklung robuster Nachweismethoden benötigt. Auch wir konnten in der Anfangsphase mit Standardmethoden aufgrund der hohen Ähnlichkeit der untersuchten *Tilletia*-Arten keine für die Testentwicklung geeigneten molekularen Markerregionen identifizieren, weshalb es notwendig wurde die Genome der drei Arten komplett zu sequenzieren.

Steinbrand und Zwergsteinbrand stellen insbesondere im ökologischen Anbau in den letzten Jahren ein immer größeres Problem für die Weizenproduktion dar, da es kaum gering anfällige, geschweige denn widerstandsfähige Sorten gibt (Aydoğdu and Kaya, 2020; Dumalasová et al., 2014; Matanguihan et al., 2011; Ruzgas and Liatukas, 2008). Zu Projektbeginn lagen noch keine detaillierten Daten zu deren genetischen Diversität, oder Genomdaten, vor. Für die Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern, zur Verwendung in den populationsgenetischen Untersuchungen, war für das Projekt eine „low-coverage"-Sequenzierung von elf Genomen geplant. Probleme bei der Entwicklung artspezifischer Marker erforderten eine zusätzliche „high coverage" PacBio-Sequenzierung, die über eine finanzielle Aufstockung bei den Unteraufträgen des Projektes ermöglicht wurde. Die Kombination der Daten aus den beiden Genomsequenzierungs-Techniken erlaubte eine deutlich detailliertere Genomanalyse und ermöglichte insbesondere das Auffinden geeigneter Genomregionen für die artspezifische Markerentwicklung. Auf diese erhobenen Genomdaten lassen sich in Zukunft vielfältige und weitere interessante Untersuchungen und Forschungsprojekte aufbauen.

3 Material und Methoden

3.1 Vergleichsprobensammlung und Bestimmung der Tilletia-Akzessionen (LfL / JKI)

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde eine umfangreiche Sammlung an *Tilletia*-Sporenmaterial aufgebaut, mit dem Ziel für jede der Arten möglichst viele verschiedene Populationen unterschiedlicher geographischer Regionen zu erhalten, um die Bandbreite der Variabilität innerhalb und zwischen den Arten und Populationen bestmöglich abzubilden. Zusätzlich wurde ein breites Spektrum an weiteren Weizenpathogenen gesammelt, um auszuschließen, dass es bei den entwickelten *Tilletia*-Tests zu Kreuzreaktionen mit diesen kommen könnte. Das Material wurde z.T. selbst gesammelt oder von anderen Forschungsgruppen, Öko-Verbänden und Landwirten sowie Herbarien zur Verfügung gestellt. Insgesamt umfasste die Sammlung schlussendlich 268 Isolate aus 24 Ländern von allen Kontinenten mit Ausnahme der Antarktis (vgl. Tabelle A1). Bei 227 Akzessionen dieser Sammlung handelt es sich um *Tilletia*-Arten. Davon wurden 115 *T. caries*, 43 *T. laevis* und 38 *T. controversa* aus Weizenähren isoliert. Weitere 13 *T. controversa* und 18 *Tilletia*-Arten stammten von anderen Wirtspflanzen. Ferner umfasst die Sammlung 41 nahverwandte Pilze bzw. andere Getreidepathogene (z.B. *Ustilago* spp., *Fusarium* spp., *Puccinia* spp.). Die dauerhafte Sicherung der Kulturen ist ein wichtiger Aspekt, um die Wiederholbarkeit der Versuche zu gewährleisten und zukünftige weitere Untersuchungen zu ermöglichen. Deshalb wurden 54 Steinbrand- und Zwergsteinbrand-Proben ausgewählt und per Einzel-Teliosporen-Kultur auf Spezial-Medium kultiviert (Trione, 1964). Diese Reinkulturen wurden gefriergetrocknet (lyophilisiert) und als Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das während der Projektzeit selbst gesammelte bzw. zugesendete Material wurde für eine einheitliche Klassifizierung zunächst morphologisch bestimmt. Anschließend wurden diese Daten mit dem Keimungsverhalten der einzelnen Stämme korreliert. Die ersten 107 Akzessionen wurden für die morphologische Bestimmung der Brandsporen aus intakten Brandbutten präpariert und in „Hoyer's fluid" eingebettet (Cunningham, 1972). Die so erhaltenen Dauerpräparate wurden anschließend unabhängig von sieben Expertinnen und Experten lichtmikroskopisch bestimmt (Vánky, 2012). Für die

Keimungsversuche wurden Sporen von allen Akzessionen mit 0,26 % NaClO oberflächensterilisiert, auf 2 %igem Wasser-Agar ausplattiert und bei 5 °C sowie 15 °C inkubiert. Sporen von *T. caries* und *T. laevis* (Steinbrand) keimen für gewöhnlich bei 14 - 16 °C innerhalb der ersten vier bis fünf Tage nach Inokulation, Sporen von *T. controversa* (Zwergsteinbrand) benötigen mindestens vier bis sechs Wochen bei 5 °C bevor die Keimung beginnt (Lowther, 1950; Meiners, 1959). Die Sporen der Sammlung wurden hinsichtlich des Keimbeginns und der Keimfähigkeit einer dieser beiden Art-Gruppen zugeordnet. Abschließend erfolgte die Klassifizierung der Akzessionen anhand der kombinierten Ergebnisse der morphologischen Bestimmung und des Keimverhaltens der Brandsporen. Die Bestimmung der weiteren Akzessionen, die im Verlauf des Projektes die Sammlung ergänzten, erfolgte anhand der morphologischen Merkmale durch drei Expertinnen und Experten, ohne Durchführung der sehr aufwändigen Keimungstests.

3.2 Genomsequenzierung und -analyse (JKI)

Aus unserer Sammlung der 54 Dauerkulturen wurden elf Einzelsporkulturen, davon vier Isolate von *T. caries,* zwei Isolate von *T. laevis* und fünf Isolate von *T. controversa,* für die Genomsequenzierung ausgewählt (Tabelle 1). Die gesamte genomische DNA wurde mit einer modifizierten CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-DNA-Isolierungsmethode extrahiert. Alle Isolate wurden auf einem Illumina HiSeq 4000 und 125×2 Modus bei GATC (Konstanz) sequenziert. Eines der *T. controversa*-Isolate wurde auf einer Sequenzierplattform von Pacific Biosciences (PacBio) mit 7 SMRT (Single-molecule real-time sequencing)-Zellen als Referenzgenom sequenziert. Anschließend wurden *de novo* Genomassemblierungen mit verschiedenen bioinformatischen Softwarepaketen wie Velvet 1.2.10 (Zerbino and Birney, 2008) und Canu (Koren et al., 2017) durchgeführt. Schließlich erfolgten

Tabelle 1. Informationen zu den für die Genomsequenzierungen verwendeten Pilzisolate

Taxon	Akzessions-ID	Sammeljahr	Sequenziermethode	Herkunft	Wirt	Sammler	Stamm-Nummer
T. caries	AA11	2015	Illumina HiSeq 4000	Österreich	*T. aestivum*	A. E. Müllner	CBS[1] 144825
T. caries	AI	2015	Illumina HiSeq 4000	Italien	*T. durum*	V. Weyermann	CBS 145171
T. caries	AO	2014	Illumina HiSeq 4000	Deutschland	*T. aestivum*	R. Bauer	CBS 145172
T. caries	AZH3	2015	Illumina HiSeq 4000	Schweiz	*T. aestivum*	V. Weyermann	CBS 145166
T. controversa	OA2	2015	Illumina HiSeq 4000	Österreich	*T. aestivum*	A. E. Müllner	CBS 145169
T. controversa	OL14	2014	Illumina HiSeq 4000	Deutschland	*T. aestivum*	H. Mitterer	CBS 145167
T. controversa	OR	2013	Illumina HiSeq 4000 PacBio RS II	Deutschland	*T. aestivum*	R. Bauer	CBS 144827
T. controversa	OV	2011	Illumina HiSeq 4000	Deutschland	*T. aestivum*	R. Bauer	CBS 145170
T. controversa	OW	2013	Illumina HiSeq 4000	Deutschland	*T. aestivum*	R. Bauer	CBS 145168
T. laevis	LLFL	2015	Illumina HiSeq 4000	Deutschland	*T. aestivum*	R. Bauer	CBS 144826
T. laevis	L-19	-	Illumina HiSeq 4000	-	*T. aestivum*	R. J. Metzger/ B. Goates	CBS 145173

[1] Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS), Utrecht, The Netherlands

Genmodellvorhersagen mit BREAKER (Hoff et al., 2015) und GeMoMa (Keilwagen et al., 2016). Die Genome wurden analysiert, um (1) erste Einblicke in die genomische Diversität dieser drei bedeutenden pathogenen Pilze zu bekommen, (2) Mikrosatelliten-Marker für populationsbiologische Studien detektieren und entwickeln zu können, und (3) artspezifische Genomregionen für die diagnostische Testentwicklung (qPCR, LAMP) identifizieren zu können.

3.3 Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern und Populationsstudien an *T. caries*, *T. laevis* und *T. controversa* (JKI)

Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNA-Abschnitte im Genom eines Organismus, die sich mehrfach wiederholen und ein hohes Maß an Polymorphismus besitzen (Ellegren, 2004). Diese Genomregionen können sowohl zur Artdifferenzierung als auch für die Untersuchung der Populationsstruktur und -dynamik von Arten genutzt werden. Um geeignete Mikrosatelliten-Regionen für die hier untersuchten *T.* caries, *T. laevis, und T. controversa* identifizieren zu können, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thines (Universität Frankfurt am Main) zunächst die Assemblierung der Genome durchgeführt.

Mit Hilfe der Software „Msatcommander v.0.8.2“ wurden anschließend Mikrosatelliten in der Genomsequenz von *T. controversa* gesucht. Aufgrund der von uns gewählten Kriterien wurden die folgenden Mikrosatelliten ausgewählt: 3-Mere mit mindestens 7 Wiederholungen, 4-Mere mit mind. 6 Wiederholungen, 5-Mere mit mind. 5 Wiederholungen und 6-Mere mit mind. 4 Wiederholungen. Im Anschluss erfolgte die Computer-basierte Extraktion von 150 bp langen Sequenzbereichen, die die Mikrosatelliten selbst und flankierende Genombereiche umfassten. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit allen verfügbaren *Tilletia*-Genomen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus verglichen, um das Ausmaß des Polymorphismus jedes Locus zu bestimmen. Anschließend wurden Primer für die flankierenden Bereiche entwickelt und diese MSAT-Primer wurden an je zwei *T. caries, T. laevis,* und *T. controversa*-Isolaten getestet. Diejenigen Primerpaare, welche erfolgreich alle sechs Isolate amplifizierten, wurden anschließend an 219 Isolaten getestet (vgl. Tabelle A1). Dies erfolgte mittels Duplex- und Triplex-PCR (Type-it, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) unter der Verwendung verschiedener Fluoreszenz-markierter Primer (FAM, HEX, TAMRA). Die Größe der Amplikons wurde (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof Eva. Zyprian, JKI Siebeldingen) auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät (ABI 3130 XL) bestimmt. Neben den üblichen *T. caries, T. laevis* und *T. controversa*-Proben von Weizen untersuchten wir in der Populationsstudie auch *T. controversa* von anderen Wirten, sowie einige nicht bis zur Art bestimmte *Tilletia*-Akzessionen. Die gefundenen Allelgrößen wurden zur Erstellung von Allel-Sharing-Matrizen verwendet und die Cluster-Analyse wurde mit der Software Phylip 2.3 (Felsenstein, 1989) durchgeführt.

3.4 Detektion spezifischer Genomregionen durch vergleichende Genomanalysen für die Entwicklung von Markern zum Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR und LAMP (JKI)

Um eine Zielregion zu finden, die spezifisch für *T. controversa* ist, wurde eine Bioinformatik-Pipeline entwickelt. Hierbei wurden die elf von uns sequenzierten Genome mit Genomdaten weiterer *Tilletia*-Arten (6 *T. indica*, 1 *T. horrida*, 1 *T. walkeri*, 1 *T. caries* und 1 *T. controversa*) ergänzt, die inzwischen in

GenBank veröffentlicht worden waren. Insgesamt wurden somit 21 Genome für den Vergleich und die Entwicklung des spezifischen Tests herangezogen. Das Vorgehen umfasste mehrere aufeinander folgende Schritte. Es kann als ein subtraktives Verfahren verstanden werden, bei welchem nach und nach sämtliche in den verschiedenen Genomen gemeinsam vorkommende Genomregionen ausgeschlossen werden, bis nur noch Genomregionen übrigbleiben die nur in der Ziel-Art, hier *T. controversa*, vorhanden sind. Dabei wird eine immer größere Stringenz der Vergleichsparameter angewendet. Im ersten Schritt wurden alle Genomregionen ausgeschlossen, die sowohl in *T. caries, T. laevis* und *T. controversa* vorkamen. Hierzu wurden zunächst kurze Fragmente jedes Genoms (200 bp Länge) mittels der Software BLAST (Altschul et al., 1990) mit sämtlichen anderen Genomen verglichen. Fragmente eines *T. controversa*-Genoms, die keinen Treffer in Nicht-Zielgenomen (*T.caries* und *T. laevis*) zeigten, also nur in *T. controversa* vorhanden waren, wurden extrahiert. Dann wurde versucht diese Fragmente mittels überlappender identischer Sequenzbereiche anderer kurzer Fragmente zu längeren zusammenhängenden Genomregionen (sogenannten Contigs) zu verbinden. Die längeren Contigs wurden dann wiederum mittels des BLAST-Algorithmus mit allen anderen untersuchten Genomen verglichen. Falls sie in Nicht-Zielgenomen (*T.caries* und *T. laevis*) einen Treffer hatten, wurden sie ausgeschlossen. Schließlich wurden sämtliche Contigs, die nicht in allen sechs untersuchten *T. controversa*-Genomen vorhanden waren, ebenfalls ausgeschlossen. Im Laufe dieser Arbeit wurde ein ähnliches Verfahren von einer anderen Arbeitsgruppe unter dem Namen RUCS „rapid identification of PCR primers for unique core sequences“ (Thomsen et al., 2017) veröffentlicht. Auch mit dieser unabhängig entwickelten Methode konnten wir *in silico* die von uns ausgewählten Genregionen als geeignet für die Testentwicklungen bestätigen.

3.5 Testentwicklung

3.5.1 Entwicklung eines LAMP-Tests zum Nachweis von *T. controversa* (JKI)

Genomische DNA wurde aus Sporen oder Pilz-Reinkulturen extrahiert. Die Sporen- bzw. Hyphenhomogenisierung erfolgte in Eppendorf-Gefäßen mit Hilfe von drei Stahlkugeln und einer Schwingmühle (Qiagen Tissuelyser II, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Die DNA-Extraktion erfolgte anschließend mit dem Qiagen Plant DNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Primer für die Amplifikation der detektierten spezifischen Genomregionen wurden mit Hilfe der Software (PrimerExplorer V.5) entwickelt. Die Spezifität dieser Primer-Sets wurde zunächst an einer Kollektion von sechs Isolaten getestet. Anschließend erfolgte die Testung an 182 *Tilletia*-Akzessionen (vgl. Tabelle A1). Die entsprechenden Isolate wurden zwischen 1922 und 2018 gesammelt. Sie umfassen auch das JKI-eigene Herbarium. Ergänzt wurde diese Probenkollektion durch 41 weitere phytopathogene Pilze (vgl. Tabelle A1).

Insgesamt wurden 223 Proben getestet, wobei 39 zu *T. controversa* gehörten (vgl. Tabelle A1). Die folgenden Gruppen von Pathogenen wurden als Negativkontrollen ausgewählt: (1) Arten die in einer sehr engen phylogenetischen Beziehung zum Zielerreger stehen (91 *T. caries* und 40 *T. laevis*); (2) Weitere mit der Zielart verwandte Pathogene (andere *Tilletia*-Arten, andere Vertreter der Brandpilze (Ustilaginomycetes); (3) Andere Weizen-Pathogene (z. B. *Fusarium* spp.); (4) Pilze, die aufgrund ihrer starken Sporenbildung und ihrer Windverbreitung (z. B. *Penicillium* spp.) in der Umwelt häufig sind. Ein

besonderes Augenmerk wurde auch daraufgelegt, dass die untersuchten Isolate einen möglichst breiten geographischen Raum abdecken. Dies ist bei einem sehr weit verbreiteten Pathogen besonders wichtig, insbesondere wenn keine Informationen über die Populationsvielfalt bzw. -struktur des Zielorganismus vorliegen.

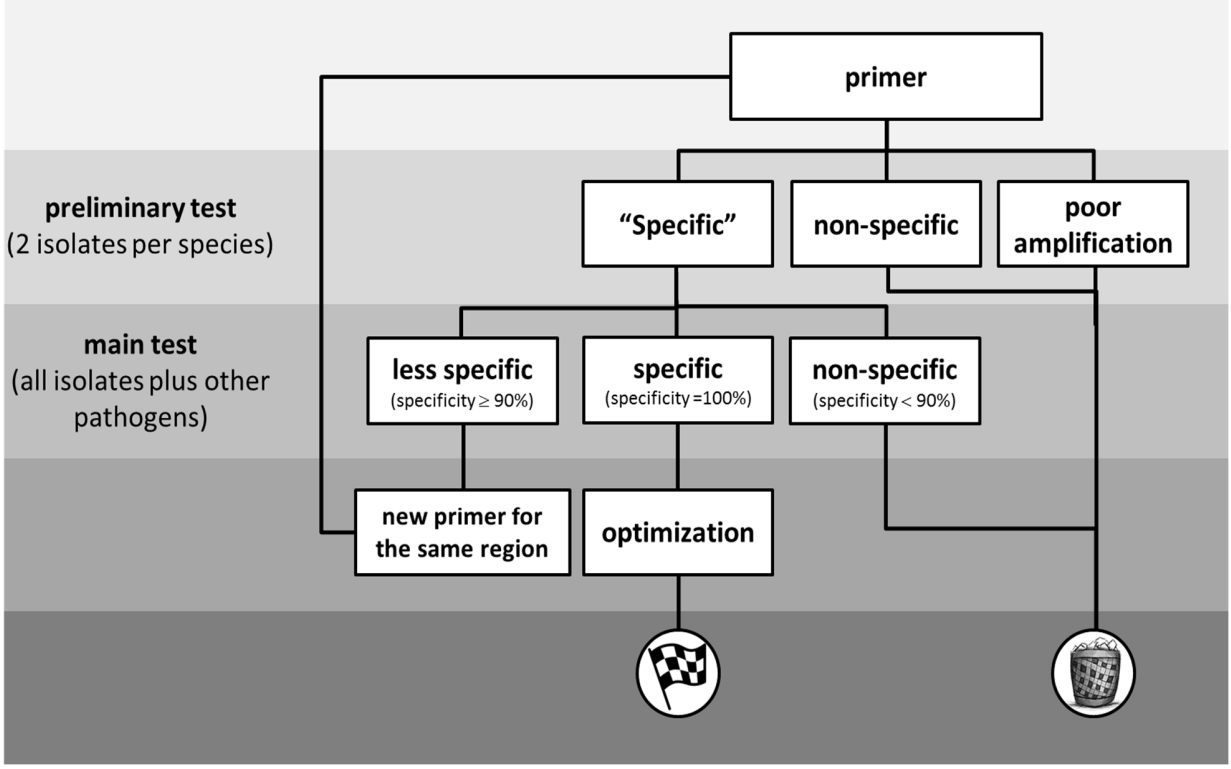

Abbildung 1. Ablaufschema der Primerentwicklung und -testung

Der LAMP-Test wurde als „kolorimetrische Endpunkt-Detektionsmethode" entwickelt. Das heißt Proben, die positiv auf *T. controversa* getestet werden, werden durch einen Farbumschlag im Reaktionsgefäß erkannt. Es wurden die Farbstoffe Calcein, Neutralrot, Phenolrot, Hydroxylnapthalblau getestet und optimiert.

3.5.2 Eignungsprüfung des LAMP-Nachweises von *T. controversa* – Evaluierung der Robustheit der Methode in anderen Laboren (JKI)

Um die Reproduzierbarkeit und Robustheit des in unserem Labor validierten LAMP-Tests bei der Anwendung in anderen Laboren zu bewerten, führten wir eine Eignungsprüfung mit fünf deutschen Pflanzenschutzämtern und Saatgutprüflaboren durch. Die teilnehmenden Labore erhielten hierzu von uns isolierte DNA, sämtliche Reagenzien und sollten anhand einer mitgelieferten Probenbeschreibung die LAMP-Reaktion durchführen und das Testergebnis auswerten.

Für die Probenvorbereitung wurde die genomische DNA aus Teliosporen von vier *T. caries*, fünf *T. controversa* und drei *T. laevis*-Proben, die nach dem Zufallsprinzip aus unserer *Tilletia*-Sammlung

ausgewählt wurden, extrahiert. Die Endkonzentration der DNA-Extrakte wurde auf 500 pg/µL eingestellt. Eine der *T. controversa*-Proben wurde zusätzlich in einer Serienverdünnung von 50, 5 und 0,5 pg/µL hergestellt, um das Verhalten hin zur Nachweisgrenze des Tests zu evaluieren. Alle 15 DNA-Proben wurden kodiert und von jeder DNA-Probe wurden Aliquots hergestellt. Die Teilnehmer wurden gebeten, ein Foto der LAMP-Assay-Ergebnisse vorzulegen und die Farb-Reaktionen als positiv oder negativ zuzuordnen. Die Test-Eigenschaften wurden nach den Formeln in Tabelle 2 ausgewertet.

Tabelle 2. Berechnung der Test-Eigenschaften anhand der Anzahl der Proben die richtig positiv (RP), richtig negativ (RN), falsch positiv (FP) oder falsch negativ (FN) sind

Test-Eigenschaften	**Berechnung [%]**
Sensitivität	RP / (RP+FN)
Spezifität	RN / (RN+FP)
positiver Vorhersagewert	RP / (RP+FP)
negativer Vorhersagewert	RN / (RN+FN)
Testgenauigkeit	(RP+RN) / Gesamtzahl

3.5.3 Entwicklung einer qPCR-Methode zum Nachweis von *T. controversa* (LfL)

Der Nachweis von *T. controversa* an Weizen mittels qPCR erfolgt in drei Hauptschritten, beginnend bei der Probenvorbereitung, über die DNA-Extraktion bis zur abschließenden qPCR Analyse mit Auswertung der Sporenzahl pro Korn (siehe Abbildung 2).

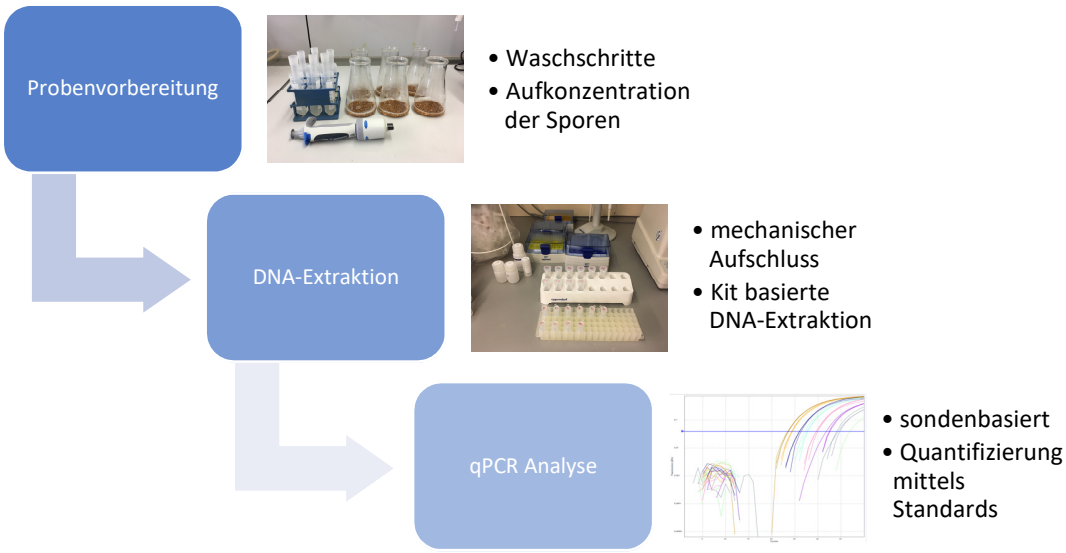

Abbildung 2. Ablaufschema der Arbeitsschritte zum Nachweis von *T. controversa* an Weizen

Probenvorbereitung

Das Protokoll zur Probenvorbereitung basiert auf den Vorgaben der optimierten Filtrationsmethode (Schumann et al. 2016) und wurde für die weiteren Bearbeitungsschritte in wenigen Punkten angepasst.

Es wurden je Probe 3x 20 g Weizenkörner abgewogen, von grobem Schmutz und Fremdbesatz befreit und die Körner gezählt. Diese wurden 2x für 5 min mit 25 mL Waschlösung (Wasser, steril, deionisiert + 0,1 % Tween®20) unter Schütteln gewaschen und die Suspension in 50 mL Reaktionsgefäße mittels Pipette überführt. Nach Anpassung des Volumens durch Zugabe von Waschlösung wurden die Lösungen für 30 min bei 4 °C und 3.345 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 500 µL abgenommen. Das gebildete Sporenpellet wurde in der verbleibenden Lösung eluiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß inkl. Keramikkugeln (Lysis Tube X, Analytik Jena, Jena, Deutschland) pipettiert. Das 50 mL Gefäß wurde 3x mit 200 µL Wasser gespült und die Lösung ebenfalls in das Lysis Tube überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g wurde der Überstand bis auf etwa 200 µL abgenommen und das verbleibende Sporenpellet wurde im Lysis Tube bei – 20 °C eingefroren oder konnte direkt für die DNA-Extraktion weiterverwendet werden.

DNA-Extraktion

Die Isolation der DNA aus den Teliosporen, sowie der weiteren im Sporenpellet vorhandenen organischen Bestandteile, wurde mit dem DNeasy PowerPlant® Pro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) in leicht modifizierter Form durchgeführt. Zum Sporenpellet im Lysis Tube wurden alle Lyse-Puffer inklusive der „Phenolic Separation Solution“ hinzugegeben. Der mechanische Aufschluss erfolgte mit dem FastPrep-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Hierfür wurden die Proben für 2x 40 sec bei 6,5 m/s (entspricht ca. 4.000 rpm bei anderen Homogenisatoren) mit einer ein- bis zweiminütigen Ruhepause zwischen den Läufen homogenisiert. Die folgende Zentrifugation wurde bei 16.000 x *g* für 5 min durchgeführt, um den gebildeten Schaum zu reduzieren. Im weiteren Verlauf wurde das gesamte Volumen verwendet und die Reagenzien nach einem Kühlungsschritt in einem 5 mL Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Zentrifugation durch das MB Spin Column wurde nachfolgend insgesamt dreimal durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in 100 µL bei 3000 x *g* für 2 min, wobei das Eluat zudem ein zweites Mal geladen und bei 10.000 x *g* zentrifugiert wurde. Die DNA wurde direkt für die qPCR-Analyse weiterverwendet sowie bis zu einer Woche bei 2 – 8 °C und für längere Zeiträume bei – 20 °C gelagert. Zum Projektende wurde die Produktion des verwendeten Kits eingestellt. Als geeignete Alternative wurde das DNeasy PowerSoil® Pro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) getestet. Auch hier waren kleinere Anpassungen notwendig, die in Anlehnung an dem hier beschriebenen Protokoll entsprechend übertragen werden konnten.

qPCR Analyse

Die Analyse der isolierten DNA erfolgte mit dem AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) unter Einsatz des Promega GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Für das verwendete Gerät wurde der CXR Referenzfarbstoff in geringer Konzentration dem Mix hinzugefügt. Der Reaktionsmix bestand aus Master Mix (1X), Forward und Reverse Primer (10 µM) je 200 nm, qPCR Sonde (10 µM) 100 nm und Nuklease-freiem Wasser, ergänzt auf ein Volumen von 17 µL je Reaktion. Zur Analyse wurden je Reaktionsgefäß 3 µL Template-DNA eingesetzt. Insgesamt wurden neun Reaktionen pro Untersuchungsprobe (Triplikat in der Vorbereitung und erneut Triplikat bei der qPCR Analyse) durchgeführt. Die 96-well Platte wurde mit Deckelstreifen (optical strip caps, beides Agilent Technologies) verschlossen. Das 3-Schritt PCR-Programm umfasste eine

Aktivierung der Polymerase für 2 min bei 95 °C gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung 15 sec bei 95 °C, Annealing 30 sec bei 64 °C und Extension 30 sec bei 72 °C. Die Erfassung der FAM Fluoreszenz erfolgte zum Ende des Annealing-Schrittes. Zur Quantifizierung des qPCR Ergebnisses wurden definierte Standards im Bereich von 1.233.000 bis 5.074 Sporen (entspricht ca. 3.000 bis 10 S/K) als Template eingesetzt. Für die Vergleichbarkeit zwischen mehreren Analyseläufen wurde der Interplate Calibrator (IPC) von TATAA Biocenter (Göteborg, Schweden) nach Protokoll verwendet. Dadurch war es möglich alle untersuchten Proben einheitlich anhand einer Standardkurve zu quantifizieren. Die ermittelte Quantität wurde abschließend durch die zuvor bestimmte Körnerzahl (Probenvorbereitung) geteilt, um die gewünschte Einheit „Sporen pro Korn (S/K)“ als Ergebnis zu erhalten. Das finale Ergebnis ergab sich aus den gemittelten Werten der Triplikate je Untersuchungsprobe.

3.5.3.1 Qualitativer Nachweis und Überprüfung der Spezifität

Die elf potentiell zur diagnostischen Marker-Entwicklung geeigneten Fragmente (siehe 3.4) wurden genutzt, um qPCR Primer und Sonden zum spezifischen Nachweis von *T. controversa* zu generieren. Nach einer Vorprüfung wurden 6 der über 30 erstellten Primerpaare (Primer3web V4.1.0) intensiv an der Sporensammlung getestet. Hierfür wurden Sporen aus den Brandbutten herausgelöst und deren DNA wie oben beschrieben isoliert. Das vielversprechendste Primerpaar und die zugehörige Sonde wurden insgesamt an 224 Akzessionen, darunter 34 *T. controversa*, 157 andere *Tilletia* Arten sowie 33 weiteren Pathogenen des Weizens hinsichtlich seiner Spezifität überprüft. Mittels ROC-Analyse (receiver operating characteristic) wurde die Sensitivität und die Spezifität des qPCR-Tests evaluiert und basierend auf diesen beiden Parametern der optimale qPCR-Zyklus („optimal cutoff point“) zur Beendigung der Analyse bzw. Wertung der Analyseergebnisse abgeleitet (Nutz et al., 2011). Im späteren Verlauf der Methodenentwicklung, nach den ersten Analysen von Routineproben aus der Saatgutuntersuchung, wurde Zyklus 32 als optimaler Endpunkt ermittelt und auf alle anderen statistischen Auswertungen übertragen. Zur Bewertung der „Test Performance“ sowie Genauigkeit der neuen Nachweismethode wurden die Parameter Sensitivität (Anteil richtig positiver Testergebnisse), Spezifität (Anteil richtig negativer Testergebnisse), positiver Vorhersagewert (Anteil tatsächlich positiver Ergebnisse), negativer Vorhersagewert (Anteil tatsächlich negativer Ergebnisse) sowie die Testgenauigkeit herangezogen (siehe Tabelle 2).

3.5.3.2 Quantitativer Nachweis und Überprüfung der Sensitivität

Für die Quantifizierung der Sporenzahl wurden definierte Standards entwickelt. Das spezifische DNA-Fragment, welches mit den oben genannten qPCR-Primern amplifiziert worden war, wurde mittels Klonierung vervielfältigt. Das PCR-Produkt wurde über die Enzymschnittstellen EcoRI und HindIII in den Vektor pBluescript II KS(+) ligiert und anschließend in chemisch kompetente *Escherichia coli* TOP10 Zellen transformiert. Nach Selektion und Kultivierung (LB-Medium + Ampicillin) erfolgreich transformierter Zellen wurde das rekombinante DNA-Molekül (Plasmid) in ausreichender Menge isoliert, linearisiert, quantifiziert (Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und für die Einstellung der Standardkonzentration verwendet. Zur Bestimmung der äquivalenten Sporenzahl im Plasmid-Stock wurde die MPN (most probable number) PCR Methode, abgeleitet von der Keimzahlbestimmung in der Mikrobiologie, verwendet (Ebert et al. (2013); Mäntynen et al. (1997)). Die

Berechnung der wahrscheinlichen Kopienzahl ausgehend vom MPN-Index, bei Verwendung von 3 µL Template aus 100 µL je Verdünnungsstufe, erfolgte anhand folgender Formel:

$$wahrscheinliche\ Kopienzahl = MPN\ Index * Verdünnungsstufe\ der\ höchsten\ Stichzahl/\ 3 * 100$$

Die wahrscheinliche Sporenzahl berechnete sich wie folgt, da eine Kopie dem haploiden Plasmid entspricht und die *Tilletia* Sporen jedoch diploid sind:

$$wahrscheinliche\ Sporenzahl = wahrscheinliche\ Kopienzahl/2$$

Für den ersten Ansatz (bis zum Eignungstest) wurden die Standards ausgehend von der Stocklösung 10^{-4} und folgend 1:4 in TE-Puffer verdünnt. Im optimierten Ansatz erfolgte die Einstellung der Standards ausgehend von der Stocklösung 10^{-5} und folgend in 1:3 Verdünnungsschritten in der Matrix. Zur Gewinnung der Matrix wurden nicht infizierte Weizenkörner nach Probenvorbereitungsprotokoll aufbereitet und die DNA der Suspension isoliert, um den inhibitorischen Einfluss von realen Untersuchungsproben simulieren zu können. Hierfür wurden auch Weizenkörner mit definierten Sporenmengen von *T. controversa* sowie *T. caries* in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe 3.5.4) künstlich infiziert. Nach den durch Nutz et al. (2011) beschriebenen Methoden wurden die Bestimmungsgrenze, LOQ (Limit of Quantification) sowie die untere Nachweisgrenze, LOD (Limit of Detection) sowohl für reine Sporensuspensionen, künstlich infizierte Weizenproben als auch für Routineproben ermittelt.

3.5.4 Eignungstest des qPCR-Nachweises von *T. controversa* – Überprüfung der Robustheit der Methode in anderen Laboren

Die entwickelte qPCR Methode zum Nachweis von *T. controversa* an Weizen wurde in verschiedenen unabhängigen Laboren auf ihre Robustheit überprüft. Am Eignungstest nahmen sieben Labore teil, denen jeweils sechs künstlich infizierte Weizenproben in Triplikaten zur Analyse zugesandt wurden. Die Proben enthielten mit *T. controversa* Sporen (OL16) kontaminierte Weizenkörner der Infektionsstärken 100 Sporen pro Korn, 20 S/K und 5 S/K, mit *T. caries* (AL15) kontaminierte Weizenkörner der Infektionsstärke 40 S/K, eine Mischprobe, bei der die Weizenkörner jeweils mit 20 S/K beider *Tilletia* Arten infiziert waren sowie eine nicht infizierte Negativkontrolle. Vor Versand an die teilnehmenden Labore wurde die gleichmäßige Verteilung der Sporenkonzentration in den Proben mittels Homogenitätstest überprüft. Hierfür wurden je zehn Teilproben mittels der optimierten Filtrationsmethode und unserer qPCR Methode analysiert. Anhand der Filtrationsmethode wurde die korrekt eingestellte Sporenzahl und mit der qPCR Methode die gleichmäßige Verteilung der cq-Werte und die korrekte Quantifizierung je Probe überprüft. Nach Eingang des letzten Ergebnisses des Eignungstests wurden erneut zwei weitere Teilproben zur Überprüfung der Probenstabilität über die Zeit analysiert (nachgeordneter Homogenitätstest). Die Labore erhielten neben den Untersuchungsproben alle benötigten Materialien und Protokolle zur Durchführung des Tests, sowie Formulare für den Ergebnisbericht. In Vortests wurden die Einstellungen für die verschiedenen in den Laboren verwendeten Homogenisatoren für den mechanischen Sporenaufschluss bei der DNA-Extraktion ermittelt. Das Protokoll wurde für den Precellys 24 (Bertin Technologies SAS, Frankreich) auf 4.000 rpm

und für den Tissue Lyser II (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) sowie die Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) auf 2x 1,5 min bei 30 Hz angepasst. Bei letzteren Geräten war eine Rotation der Tubes um 180° zwischen den Schüttelschritten erforderlich, um eine gleichmäßige Krafteinwirkung zu erzielen. Mit dem Eignungstest sollte überprüft werden 1) welchen Einfluss die verschiedenen Homogenisatoren und qPCR-Geräte auf das Ergebnis haben und 2) ob die Ergebnisse des qualitativen sowie quantitativen Nachweises reproduzierbar sind.

3.5.5 Analyse von Routineproben mittels qPCR-Nachweis

Abschließend wurde die neu entwickelte qPCR Methode zum spezifischen Nachweis von *T. controversa* an Weizenproben aus der regulären Saatgutuntersuchung evaluiert. Hierfür wurden 64 Routineproben im Zeitraum von Juli bis August des Jahres 2019 ausgewählt. Grundlage für die Auswahl war das amtliche Untersuchungsergebnis, das mit der gültigen Filtrationsmethode ermittelt worden war. Ziel der teils zufälligen und teils gezielten Auswahl war es, alle relevanten Infektionsstufen abzudecken. Neben den Grenzwerten 20 und 100 S/K sollten auch sehr stark infizierte, sowie nicht mit *T. controversa* infizierte Proben analysiert werden. Das ermittelte Ergebnis der qPCR Methode wurde anschließend mit dem amtlichen Ergebnis verglichen. Insbesondere wurde überprüft ob eine Probe je nach verwendeter Methode einmal oberhalb und einmal unterhalb eines Grenzwertes quantifiziert wurde, da dies für die spätere Anwendung der neuen qPCR Methode in der Saatgutuntersuchung von enormer Bedeutung ist. Weiterhin wurde die Sensitivität der Methode unter realen Bedingungen in der Routinediagnostik im Saatgutlabor ermittelt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die*Tilletia*-Sammlung wird im Fungarium des JKI und an der LfL aufbewahrt und sämtliche lebende Einzelsporkulturen werden als Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff am JKI aufbewahrt. Zusätzlich wurde je ein Duplikat der elf Isolate, die im Rahmen des Genomsequenzierungsprojekts verwendet wurden, in der größten Pilzstammsammlung der Welt, im Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Niederlande, ebenfalls als lebende Kulturen zur Nutzung für andere Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler hinterlegt. Die in dieser Studie produzierten Genome werden in den Genomdatenbanken „The European Nucleotide Archive (ENA)“ und „The National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ für die interessierte Fach-Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

4.1 Identifikation der *Tilletia*-Akzessionen

Die Bestimmung der ersten 107 im Projekt gesammelten und verwendeten Akzessionen, die nachfolgend als Referenzproben definiert wurden, erfolgte anhand verschiedener Methoden. In Tabelle A1, Spalte Morphologie, ist jeweils die von den Expertinnen und Experten mehrheitlich bestimmte *Tilletia* Art aufgeführt. Ergänzend zur optischen Bestimmung wurde das spezifische Keimverhalten überprüft und dieses dann einer Art-Gruppe, Steinbrand oder Zwergsteinbrand, zugeordnet (vgl. Tabelle A1, Spalte Keimung). Eine Differenzierung der beiden Steinbranderreger *T. caries* und *T. laevis* kann aufgrund des identischen Keimverhaltens (Russel and Mills, 1994) nur anhand der morphologischen Eigenschaften erfolgen. Die Akzession AI konnte nur mittels einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme der

Sporenoberfläche als *T. caries* identifiziert werden. Diese ergänzende Analyse wurde notwendig, da bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop die Sporen zwar mehrheitlich als *T. laevis* bestimmt, dabei aber erhebliche Schwierigkeiten beschrieben wurden. Die morphologisch mehrheitlich als *T. caries* identifizierte Akzession D-7 konnte hingegen aufgrund des artspezifischen Keimverhaltens als *T. controversa* bestimmt werden, wie von Hoffmann and Metzger (1976) beschrieben. Durch die Kombination der beiden Kriterien, Morphologie und Keimung, konnten insgesamt 68 *T. caries*, 10 *T. laevis*, und 29 *T. controversa* bestimmt werden, die nachfolgend als Referenzproben (N=107) für die Entwicklung der LAMP und qPCR Methode verwendet wurden. Im gesamten Projektzeitraum kamen weitere 120 *Tilletia* Akzessionen hinzu, die anhand der morphologischen Merkmale der Teliosporen als 47 *T. caries*, 33 *T. laevis* und 9 *T. controversa* mit Herkunft *Triticum* sp., sowie 13 *T. controversa* und 18 *Tilletia* spp. anderer Wirtspflanzen identifiziert wurden. Mit zusätzlichen 41 typischen Getreidepathogenen standen somit für die Überprüfung der neuentwickelten Nachweismethoden insgesamt 268 Testproben zur Verfügung.

Bei genauer Betrachtung dieser großen Anzahl an Akzessionen wurde festgestellt, dass die morphologische Variabilität der Sporen innerhalb einer Butte zum Teil sehr groß war. Die eindeutige Bestimmung einer einzelnen Spore aus einer natürlich infizierten Untersuchungsprobe mittels Filtrationsmethode kann somit in der Saatgutuntersuchung große Schwierigkeiten bereiten. Die Unterscheidung in Steinbrand und Zwergsteinbrand aufgrund des spezifischen Keimverhaltens ist hier zuverlässiger, aber aus zeitlichen und methodischen Gründen für die Saatgutuntersuchung nicht geeignet. Die ebenfalls am Getreidekorn haftenden weiteren Mikroorganismen würden bei den langen Inkubationszeiten zum Nachweis von *T. controversa* die *Tilletia* Sporen zu schnell überwachsen oder in ihrer Keimung inhibieren. Die Keimtestung ist sehr zeitintensiv und stößt zudem bei altem Sporenmaterial an ihre Grenzen. Somit wurden nicht alle in dieser Studie verwendeten Akzessionen mit dieser Methode analysiert, da es sich zum Teil auch um altes Herbarmaterial handelte. Die Absicherung der morphologischen Bestimmung, durch Expertinnen und Experten, konnte dies aber für die sogenannten Testproben kompensieren und zuverlässige Identifikationsergebnisse generieren.

4.2 Gesamtgenomsequenzierung und Genomvergleiche

Die Ergebnisse der Genomsequenzierung, der *de novo*-Assemblierung und der Annotation der Genome ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Assemblierung des *T. controversa*-Isolats „OR“, das sowohl mit PacBio als auch Illumina sequenziert wurde, führte zu 985 Contigs, einer Gesamtlänge von 49,38 Millionen Basenpaaren (Mb) und einem N50-Wert von 137.055 bp. Das bislang am besten assemblierte Genom von *T. controversa* (DAOMC 236426) in GenBank, mit der geringsten Anzahl von Contigs und der höchsten Kontiguität ist 29,9 Mb groß, umfasst 3.741 Contigs und hat einen N50-Wert von 14.874 bp. Das Genom OR hat somit 2.756 weniger und signifikant längere Contigs. Die Veröffentlichung der hier sequenzierten und assemblierten Genome bildet eine solide Basis für weitere Untersuchungen zur genomischen Diversität, zur diagnostischen Markerentwicklungen und Untersuchungen zur Pathogenität, um nur einige zu nennen.

Die Genome von *T. caries*, *T. laevis,* und *T. controversa* teilten eine hohe Ähnlichkeit auf der Genomebene. Bis zu 98 % der Genome konnten aliniert werden. Diese alinierten Genombereiche wiesen

eine Durchschnittliche Nukleotid-Identität (ANI) von mehr als 99 % auf, unter Ausschluss der repetitiven Genombereiche (Abbildung 3). In den alinierten Regionen wurde eine höhere Anzahl von Einzelnukleotid-Polymorphismen und Insertionen oder Deletionen zwischen den Isolaten von *T. controversa* gefunden. Dies zeigt, dass die Isolate von *T. controversa* genetisch vielfältiger waren als die Isolate von *T. caries* oder *T. laevis*. Die insgesamt sehr große Identität der Genome erklärt, warum die Entwicklung eines artspezifischen Markers ohne eine Gesamtgenomsequenzierung nicht möglich war.

Tabelle 3. Genomstatistik der *Tilletia*-Isolate

	T. caries				***T. controversa***					***T. laevis***	
Isolate	AA11	AI	AO	AZH3	OA2	OL14	OR	OV	OW	LLFL	L-19
Assemblierung											
Sequenzierungs-plattform	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000 and PacBio RS II	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000	Illumina HiSeq 4000
Gesamtlänge ohne N [MB]	31,36	31,71	30,32	31,25	31,90	30,67	49,38	29,40	31,10	30,84	30,85
GC-Gehalt [%]	56,5	56,5	56,6	56,5	56,5	56,6	55,7	56,6	56,5	56,5	56,5
Anzahl der Contigs	6.819	6.976	8.169	7.057	6.917	8.375	985	9.051	8.321	8.374	8.326
Längster Scaffold [kb]	148	148	122	122	105	95	858	71	75	101	101
Contig N50 Länge [kb]	17	17	12	16	17	12	137	9	11	11	11
Annotation											
Gen-Modell	9.914	9.943	9.807	9.930	9.679	9.956	10.464	9.681	9.797	10.203	10.160
Durchschnittliche Genlänge [bp]	1.789	1.734	1.756	1.766	1.812	1.705	1.931	1.720	1.754	1.671	1.674
Anzahl der Exons	36.013	35.795	35.117	35.609	35.266	34.951	40.947	33.875	34.789	35.521	35.444
Anzahl der Introns	26.443	26.446	25.784	26.109	25.944	25.832	30.419	24.837	25.549	26.258	26.220
Transkripte	10.053	10.070	9.930	10.055	9.800	10.066	10.590	9.802	9.914	10.334	10.293

In silico wurden mehrere Merkmale der Genome zwischen den drei Arten basierend auf 16 Genomen der Steinbrand- und Zwergsteinbrand-Arten verglichen, und es wurde versucht diese Merkmale mit den einzelnen Arten zu korrelieren. Auf genomischer Ebene unterschieden sich *T. caries, T. laevis* und *T. controversa* weder signifikant in ihrer Gesamtgenomgröße, der vorhergesagten Anzahl ihrer Gene noch deren Funktionen. Die Vorhersage der Genbereiche und ihrer Funktionen erfolgten auf der Grundlage ihrer Homologie mit verfügbaren manuell kuratierten Datenbanken. Die Anzahl der Gene variierte in dieser Studie zwischen 9.679 und 10.464. Dies stimmte relativ gut mit den in der Studie von Nguyen et al. (2019) berichteten Genzahlen für Steinbrand und Zwergsteinbrand überein, welche zwischen 9.649 und 9.952 lagen. Die drei *Tilletia*-Arten waren auch in anderen grundlegenden statistischen Daten der Gene, wie der Anzahl der Exons, der Introns und ihrer Häufigkeit in den Genomen einander sehr ähnlich.

Die Genomarchitektur, insbesondere der prozentuale Anteil der Transposons, kann zwischen eng verwandten Arten sehr unterschiedlich sein (Möller und Stukenbrock, 2017). Transposons sind sich

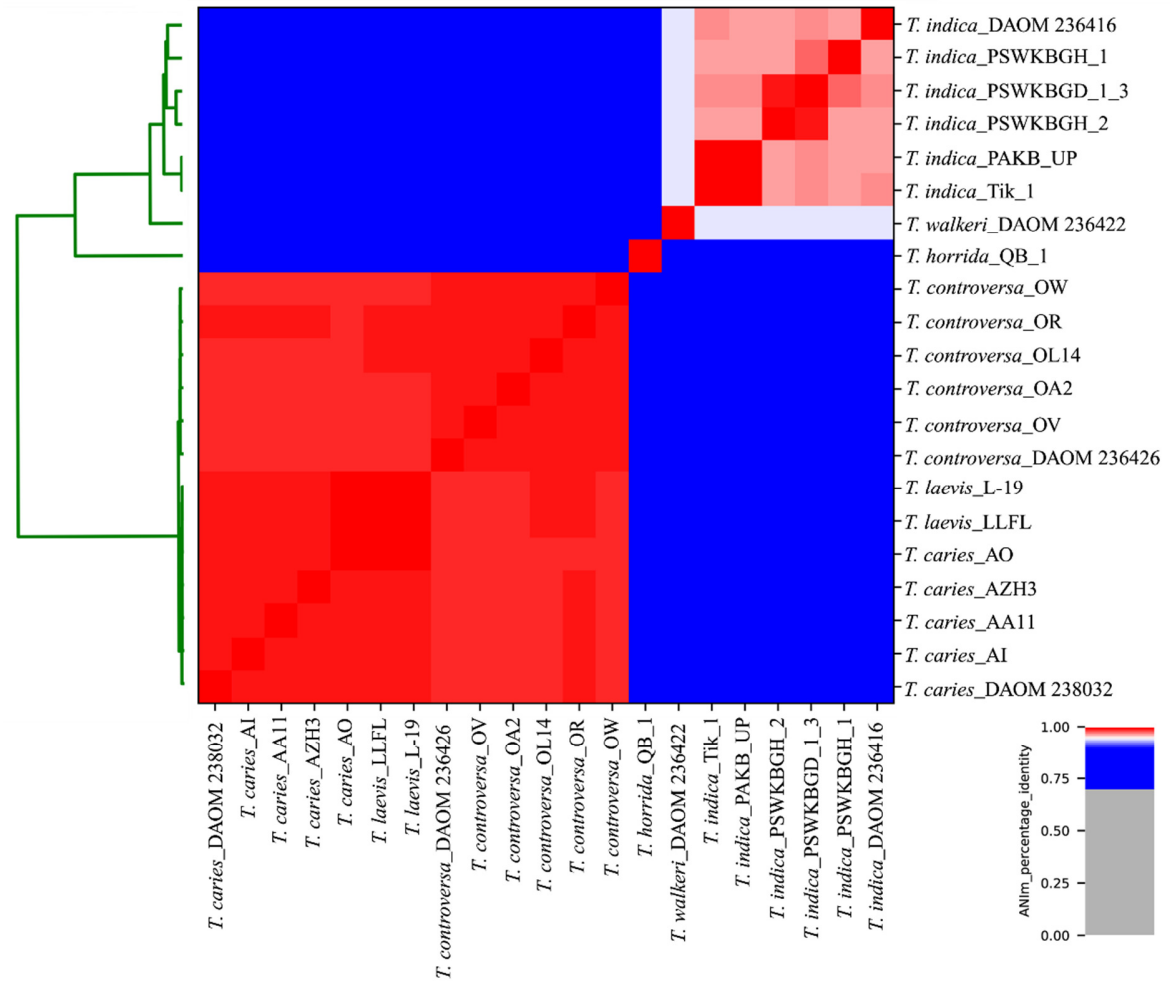

Abbildung 3. Ähnlichkeiten zwischen den Genomen von *Tilletia* spp. 21 Genome von 6 *Tilletia* spp. wurden mittels PYANI bestimmt und für die Konstruktion eines einfachen Verknüpfungs-Dendrogramms verwendet, das auf der linken Seite gezeigt wird. Die Isolate und Artzuordnungen sind als Zeilen- und Spaltenbezeichnungen angegeben. Intensiv rote Quadrate stehen für ANI-Werte von 99 % oder höher. Der hellste Rotton entspricht einer 96 %igen Identität, die zwei Rottöne zwischen den Extremen entsprechen 97 und 98%. Die blaue Farbe repräsentiert ANI-Werte von weniger als 85 % Identität.

wiederholende Sequenzen, die von einem Genombereich auf einen anderen übertragen werden können und die auf der Grundlage ihrer Ausbreitung und Insertion im Genom klassifiziert werden (Levin and Moran, 2011). So unterscheiden sich zum Beispiel *Fusarium graminearum* und *F. oxysporum*, welche zwei eng verwandte Pilzarten mit unterschiedlicher Lebensweise und ähnlicher Virulenz repräsentieren, deutlich in ihren transponierbaren Elementen (TE) (3,93 % bzw. 0,03 %) (Ma et al., 2010). Dies war bei den drei untersuchten *Tilletia*-Arten nicht der Fall. Die Unterschiede in der Anzahl TE in den verschiedenen Populationen spiegeln möglicherweise die demographische Geschichte des Erregers wider und können in den verschiedenen Populationen drastisch variieren (Oggenfuss et al. 2020).

Interessant war, dass nur 55 % der Gene einer funktionellen Gruppe zugeordnet werden konnten. Hingegen ist die Funktion der anderen 45 % der Gene noch völlig offen. Die Gesamtzahl der vorhergesagten Gene, die für sezernierte Proteine (das Sekretom) der drei untersuchten Arten kodieren, bewegt sich in einem ähnlichen Rahmen (N= 419 – 516). Dies gilt ebenso für die vorhergesagte Zahl der Gene, die für Effektoren (N= 107 – 144) kodieren. Effektoren sind kleine sezernierte Proteine, die von pathogenen Organismen produziert werden und oftmals eine entscheidende Rolle bei der Infektion, der Besiedlung und der Modifikation des Immunsystems des Wirts spielen. Mit 597 vorhergesagten sezernierten Proteinen bewegt sich auch *T. horrida* (Wang et al., 2018) in einer ähnlichen Größenordnung, wohingegen die Abundanz dieser Gene bei *T. indica* mit 829 deutlich höher ist (Gurjar et al., 2019; Mishra et al., 2019; Singh et al., 2020).

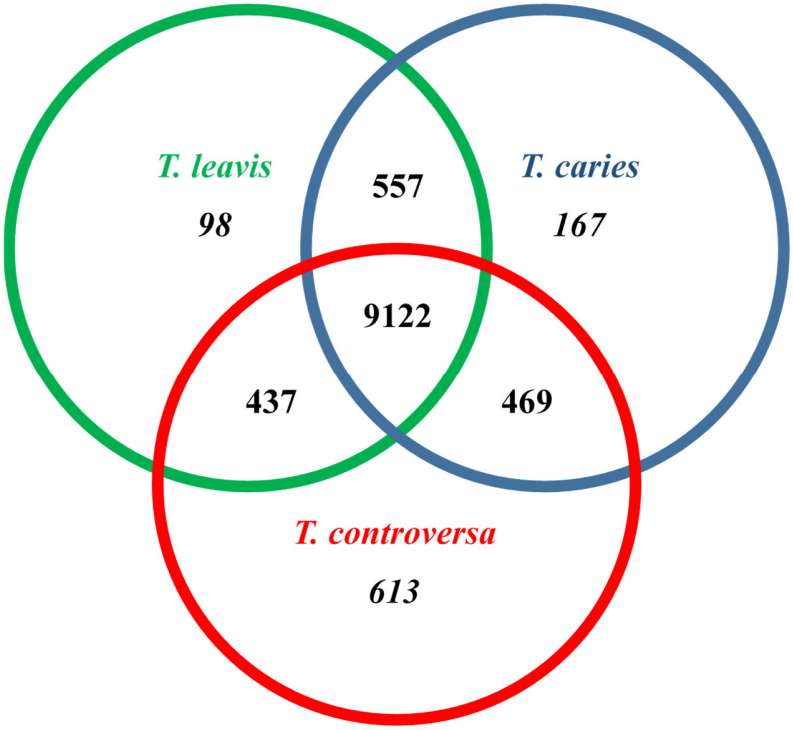

Abbildung 4. Verteilung der Orthocluster von 16 Isolaten von *T. caries*, *T. laevis,* und *T. controversa*. Das Venn-Diagramm zeigt die Verteilung der insgesamt 11.463 Orthocluster zwischen den drei Arten unabhängig von innerartlicher Variabilität. Die Mehrheit dieser Cluster (9.122) wird zwischen allen drei Arten geteilt (mit je mindestens einem Isolat). 98 Orthocluster sind spezifisch für *T. laevis*, 167 für *T. caries* und 613 für *T. controversa*.

Um artspezifische proteinkodierende Gene *in silico* zu finden, wurde eine Cluster-Analyse der orthologen Proteine durchgeführt. Mehr als 97 % der insgesamt bei allen Isolaten vorhergesagten Proteine konnten einem von 11.463 Clustern zugeordnet werden (Abbildung 4). Nur sehr wenige Protein-Cluster (0,09 % der Gesamtproteine, vgl. Tabelle 4), waren artspezifisch und die Mehrheit von ihnen hatte eine

unbekannte Funktion. Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen im Labor wären notwendig, um die Funktion dieser artspezifischen proteinkodierenden Gene zu bestimmen.

Tabelle 4. Anzahl von Genen die einzigartig für eine Art sind und in allen Isolaten dieser Art vorkommen

	T. caries	***T. controversa***	***T. laevis***	***T. caries/T. laevis***
Artspezifische Gene	1	21	3	19

4.3 Entwicklung von Mikrosatelliten und Implikationen der Mikrosatellitenanalysen für die Populationsstruktur der untersuchten *Tilletia*-Isolate

Insgesamt wurden 2.398 Mikrosatelliten einzeln auf ihre Struktur und Eignung untersucht. Von diesen 2.398 Mikrosatelliten waren 968 3-Mere mit mindestens 7 Wiederholungen, 204 4-Mere mit mind. 6 Wiederholungen, 154 5-Mere mit mind. 5 Wiederholungen und 1.072 6-Mere mit mindestens vier Wiederholungen. Zunächst wurden 285 Mikrosatelliten aufgrund ihrer Struktur *in silico* vorausgewählt und von diesen wiederum 41 für die Testung im Labor verwendet. Siebzehn dieser Mikrosatelliten waren artspezifisch und 24 polymorph. Letztere können somit zur Differenzierung von Populationen innerhalb der Arten genutzt werden Diese unterschieden sich im Grad des Polymorphismus zwischen und innerhalb der drei Arten und kamen in Varianten von mindestens 3 Allelen bis zu maximal 23 Allelen vor, nachdem sie mit unserer gesamten Probensammlung verglichen wurden.

Die anhand der Mikrosatelliten-Daten durchgeführte Cluster-Analyse (Abbildung 5) lieferte einige interessante Ergebnisse und wird hier insbesondere in Bezug zu *T. caries, T. laevis,* und *T. controversa* diskutiert. Sämtliche Proben von *T. caries* und *T. laevis* bilden das oberste (dunkelblaue) Cluster des Kladogramms. Innerhalb dieses Clusters gab es keine weitere Unterteilung der untersuchten Populationen entlang der traditionellen Artgrenze von *T. caries* und *T. laevis.*

Isolate von *T. controversa* auf Weizen und *T. secalis* auf Roggen bilden ebenfalls ein klar definiertes Cluster (rot). Die hier untersuchten Vertreter der zwei Arten bilden ebenfalls keine Untergruppen entlang der definierten Artgrenzen. Sollte sich dieser Befund allerdings auch mit mehr Vertretern der Art erhärten und sich *T. controversa* und *T. secalis* anhand der Mikrosatelliten-Daten und phylogenetischer Daten nicht klar trennen lassen, wäre es verständlich wieso es sowohl im LAMP- als auch im qPCR-Test zu „falsch-positiven“ Nachweisen von *T. secalis* kam.

Interessanterweise wurde auch weder innerhalb des *T. caries*- / *T. laevis*-Clusters noch innerhalb des *T. controversa*- / *T. secalis*-Clusters eine interne Gruppierung gefunden, die der jeweiligen geographischen Herkunft verschiedener Isolate entspräche. So können z.B. Populationen von *T. controversa*, die aus Deutschland stammen nicht von solchen die aus Nordamerika stammen unterschieden werden. Dies spricht für einen regelmäßigen Genfluss zwischen den Populationen auf den verschiedenen Kontinenten. Die plausibelste Erklärung hierfür besteht in der Annahme, dass durch den globalen Handel von Saatgut, bzw. den Austausch von Züchtungssaatgut regelmäßig Pathogenpopulationen zwischen den Weizenanbaugebieten der Welt verbracht werden.

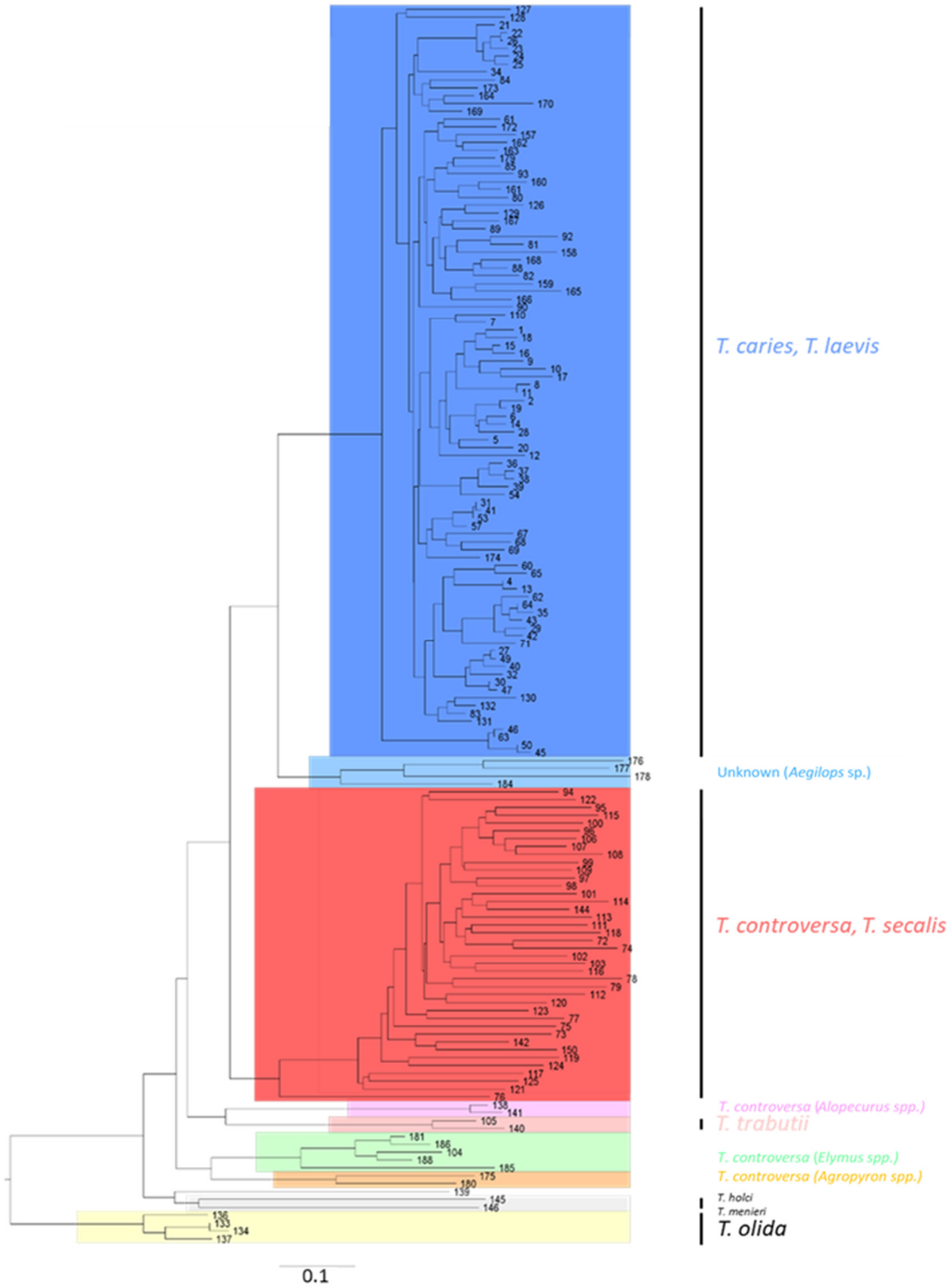

Abbildung 5. Clusteranalyse von 41 Mikrosatelliten-Loci mittels der Neighbor-Joining-Methode. Unterschiedliche Clusterfarben entsprechen Populationen mit größerer Ähnlichkeit zueinander bzw. mit einem gemeinsamen Ursprung. Die Cluster korrelieren mit bestimmten *Tilletia*-Arten bzw. verschiedenen Wirtsarten oder -gattungen (siehe Beschriftung an den Clustern, Details im Text).

Besonders interessant sind auch die Cluster im Kladogramm, die Isolate von *T. controversa* umfassen, die nicht von Weizen, sondern von Wildgräsern stammen (rosa = von *Alopecurus*; grün = von *Elymus*; orange = von *Agropyron*). Alle diese Cluster sind klar getrennt von dem großen „blauen" Cluster, welches die Isolate von *T. controversa* auf Weizen umfasst. Es scheint sich dabei um klar eigenständige Populationen zu handeln und es kann vermutet werden, dass diese keine Rolle als Reservoir für die Infektion von Weizen spielen, möglicherweise sogar eigenständige Arten darstellen. Dies kann aber nur mit unabhängigen Methoden und Untersuchungen geklärt werden.

Wie die längeren Astlängen in der Clusteranalyse zeigen, fanden wir eine höhere genetische Diversität innerhalb der *T. controversa*-Proben im Vergleich zu *T. caries / T. laevis*. Dies gilt nicht nur für die Mikrosatelliten-Analyse, sondern auch für die Anzahl von SNPs und Indels, welche in der Genomanalyse gefunden wurden. Dieser Befund korreliert auch mit der Tatsache, dass *T. controversa* und *T. caries / T. laevis* unterschiedliche Paarungssysteme haben. Während *T. controversa* ein multiallelisches System zur Paarung aufweist, haben *T. caries* und *T. laevis* ein biallelischen System. Allerdings ergaben unsere populationsbiologischen Analysen, dass sowohl bei *T. controversa* als auch bei *T. caries* und *T. laevis*, ein Defizit in der Heterozygotie vorliegt, was impliziert, dass bei allen Arten Selbstung eine große Rolle spielt.

4.4 Detektion geeigneter Genomregionen für die spezifische Primer-Entwicklung für qPCR und LAMP

Die Extraktion von artspezifischen DNA-Bereichen, die sich für das Primerdesign eignen, war nur bei *T. controversa* möglich. Insgesamt wurden 22 Contigs mit einer Länge von mehr als 1.500 bp vorselektiert, die sowohl Gensequenzen als auch intergenische Regionen beinhalteten. Elf dieser Fragmente enthielten offene Leseraster, die als besonders geeignet für die Testentwicklungen der qPCR und LAMP eingeschätzt und somit für die Verifizierung ihrer Tauglichkeit im Labor ausgewählt wurden. In der bioinformatischen Analyse konnten auch 21 Gene gefunden werden, die für *T. controversa* spezifsch waren im Vergleich zu *T. caries* und *T. laevis* (vgl. Tabelle 4).

Dieser Ansatz war für die Entwicklung von Markern für *T. caries* und *T. laevis* aufgrund der hohen Ähnlichkeit ihrer Genome nicht möglich. In diesem Fall sollten die artspezifischen Marker höchstens auf der Basis einzigartiger SNPs entwickelt werden. Betrachtet man jedoch *T. caries* und *T. laevis* zusammen, so finden sich mehrere Genregionen die für diese beiden „Arten" spezifisch sind und nicht in *T. controversa* vorkommen. Hierauf ließe sich ein entsprechend spezifischer Test für den gemeinsamen Nachweis von *T. caries/T. laevis* entwickeln. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass nur ein spezifisches Gen für *T. caries* und nur drei für *T. laevis* gefunden wurden. Betrachtet man die zwei Arten aber zusammen so finden sich 19 Gene, die nicht in *T. controversa* vorkommen (vgl. Tabelle 4). Es scheint deshalb eindeutig weniger schwierig zu sein Primer für den gemeinsamen Nachweis von *T. caries* und *T. laevis* zu entwickeln.

4.5 Entwicklung und Überprüfung der Nachweismethoden im Labor

4.5.1 Nachweis von *T. controversa* mittels LAMP

Basierend auf den Genomdaten wurde erfolgreich ein spezifischer Nachweis von *T. controversa* aus Teliosporen entwickelt. Für die *in silico* identifizierten elf potentiellen Genomregionen, die für die LAMP-

Entwicklung geeignet erschienen, wurden insgesamt 78 Primer-Sets (bestehend aus vier Primern) für die LAMP-basierte Identifizierung von *T. controversa* entwickelt und im Labor getestet. Mittels des schließlich für die Testentwicklung ausgewählten Primersets konnten alle untersuchten *T. controversa*-Isolate nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde insgesamt an 223 Pilzproben auf seine Spezifität überprüft und für eine 45-minütige Inkubationszeit bei 60 °C und einem Endpunktnachweis mit Neutralrot optimiert. Mit diesem Farbstoff kommt es bei positiven Reaktionen, also der Anwesenheit von *T. controversa*-DNA zu einem Farbumschlag nach pink. Die negativen Reaktionen ohne *T. controversa* bleiben hellorange (Abbildung 6). Die Nachweisgrenze für *T. controversa* lag bei 5 pg genomischer DNA. *Tilletia secalis* auf Roggen wird allerdings auch positiv getestet. Ob es sich bei *T. secalis* überhaupt um eine eigene Art handelt, ist nach unseren weiteren Untersuchungen zur Populationsstruktur der *Tilletia*-Arten zumindest etwas zweifelhaft (siehe Abbildung 5).

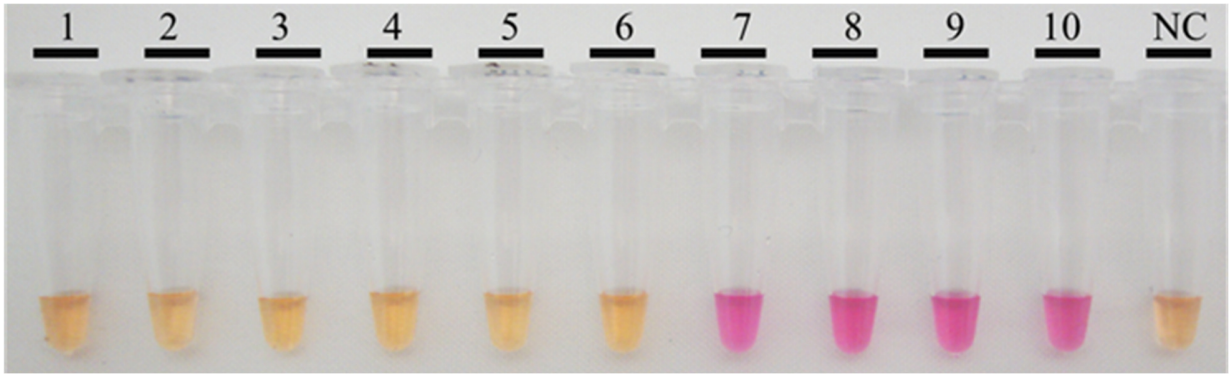

Abbildung 6. Kolorimetrischer Nachweis von *T. controversa* mit Neutralrot unter Tageslichtbedingungen. Der LAMP-Assay wurde bei 65 °C für 45 Minuten durchgeführt. Positive Reaktionen erscheinen in pink, während negative Reaktionen hellorange sind. 1-4 *T. caries*-Isolate, 4-5 *T. laevis*, 7-10 *T. controversa*, NC ist die Wasserkontrolle.

In dieser Studie wurde die Nachweisgrenze des LAMP-Tests auf 5 pg pro Reaktion geschätzt. Dies erfolgte unter Verwendung von genomischer DNA, die aus reinen Pilzkulturen isoliert wurde. Der entwickelte LAMP-Test ist somit ungefähr doppelt so empfindlich als ein LAMP-Test, der für den Nachweis von *T. indica* entwickelt wurde (Gao et al., 2016; Tan et al., 2016).

Das einfache Auslesen des Testergebnisses, die schnelle Durchführbarkeit und die Möglichkeit die Reaktion außer in einer PCR-Maschine prinzipiell auch in einem einfachen Wasserbad (mit einer Temperatur von 65° C) durchführen zu können, macht die Methode besonders auch für nicht gut ausgestattete Labore attraktiv, z.B. bei Einfuhrkontrollen. Die Methode erlaubt prinzipiell auch eine Weiterentwicklung für die Felddetektion, z.B. García-Bernalt et al. (2019) und Thiessen et al. (2018). Speziell für die LAMP-Methode entwickelte tragbare Geräte (z.B. Genie, Optigene Ltd., West Sussex, UK bzw. Bioranger Diagenetix, Inc., Honolulu, HI, USA) wie auch tragbare Geräte für den Aufschluss der robusten Teliosporen sind bereits auf dem Markt erhältlich (z.B. RotaPrep MonoLyser, Zymo Research).

4.5.2 Eignungstest für den LAMP-Nachweis von *T. controversa* zum Überprüfen der Robustheit in anderen Laboren

Von insgesamt 80 Reaktionen (5 Teilnehmer, die 15 gDNA-Proben und 1 Negativkontrolle testeten) erhielten wir 35 RP (Richtig Positiv), 44 RN (Richtig Negativ) und 1 FP (Falsch Positiv) Ergebnisse (Abbildung 7). Die Sensitivität (der Anteil der wirklich positiven Proben mit positivem Ergebnis) des Reproduzierbarkeitstests lag bei 100 % und die Spezifität (der Anteil der wirklich negativen Proben mit negativem Ergebnis) bei 97,7 %.

Abbildung 7. Bildnachweis der Ergebnisse des Eignungstests zum Nachweis von *T. controversa* mittels des entwickelten LAMP-Tests. A. Referenzfoto des Testausrichters (JKI). B-F. Fotos der am Test teilnehmenden Labore. Die Reaktionsfarbe wechselt zu pink, wenn *T. controversa* nachgewiesen wird. Die von Labor F gemeldete falsch positive Reaktion ist mit * gekennzeichnet. Das Foto F wurde durch eine Fotobearbeitungssoftware (Adobe Photoshop Version 6.0) farbverstärkt.

Die Ergebnisse, die im Eignungstest von den teilnehmenden Laboren erzielt wurden, lassen darauf schließen, dass der entwickelte LAMP-Test robust und mit hoher Genauigkeit arbeitet. Die Robustheit

des LAMP-Assays wird insbesondere auch durch die Tatsache unterstützt, dass die verschiedenen Teilnehmer unterschiedliche Geräte zur Amplifikation der DNA verwendeten. Zusätzlich konnten die Tests, die an der Nachweisgrenze der Methode lagen in allen teilnehmenden Laboren erfolgreich reproduziert werden. Ein Test ergab ein falsch-positives Ergebnis (Abbildung 7 F*). Möglicherweise handelt e sich bei diesem falsch-positiven Test um eine Kreuzkontamination. Die hohe Sensitivität der LAMP kann hierbei zu ihrem Nachteil werden, weil schon der Übertrag kleinster Probenmengen zu einer positiven Reaktion führen kann.

4.5.3 Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR

Im Rahmen des Projektes konnte ein Sonden-basierter qPCR Test zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *T. controversa* erfolgreich entwickelt werden.

4.5.3.1 Qualitativer Nachweis

Zuerst wurden die neu entwickelten artspezifischen Primer hinsichtlich ihrer Spezifität an den reinen Sporenisolaten der 107 Referenzproben und anschließend der 117 weiteren Testproben überprüft. Alle 34 Akzessionen von *T. controversa* konnten positiv nachgewiesen werden. Von den 190 „Nicht-*T. controversa* Proben“ wurden aus der Gruppe der Testproben vier falsch positiv amplifiziert. Daraus ergaben sich die in Tabelle 5 dargestellten Werte für die Test-Eigenschaften und die Genauigkeit des Tests. Mit der neu entwickelten qPCR Methode zum Nachweis von *T. controversa* wurde nach Berücksichtigung der hier untersuchten Proben Zwergsteinbrand zu 100 % positiv nachgewiesen. Bezieht man jedoch die falsch positiven Ergebnisse mit ein, wurde bei einer positiven Amplifikation nur zu 89,47 % tatsächlich *T. controversa* nachgewiesen (Positiver Vorhersagewert). Auf der anderen Seite handelte es sich bei 97,89 % der negativ getesteten Proben tatsächlich nicht um *T. controversa*.

Tabelle 5. Test-Eigenschaften und Testgenauigkeit des neu entwickelten qPCR Tests zum Nachweis von Teliosporen von *T. controversa*. Referenzproben N=107, inklusive Testproben N=224

Test Eigenschaften	Referenzproben [%]	inkl. Testproben [%]
Testergebnis richtig positiv (Sensitivität)	100,00	100,00
Testergebnis richtig negativ (Spezifität)	100,00	97,89
Positiver Vorhersagewert	100,00	89,47
Negativer Vorhersagewert	100,00	100,00
Testgenauigkeit	100,00	98,21

Die neu entwickelte qPCR Methode ist mit einer Testgenauigkeit von 98,21 % in der Lage *T. controversa* qualitativ nachzuweisen und von anderen *Tilletia* Arten sowie Getreidepathogenen spezifisch zu unterscheiden. Lediglich *T. lolioli*, *T. menieri* und *T. secalis* wurden falsch positiv amplifiziert. Die als *T. secalis* beschriebene Akzession wurde von Roggen (*Secale cereale)* isoliert. Allerdings kann sowohl *T. controversa* als auch *T. secalis* an Roggen wie Weizen vorkommen (Carris, 2008; Vánky, 2012). Weiterhin überschneiden sich bei beiden Arten die morphologischen Merkmale wodurch eine klare Unterscheidung schwierig ist (Durán and Fischer, 1961). Somit ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der Amplifikation von *T. secalis* gar nicht um ein falsch positives Ergebnis handelt (vgl. auch 4.3 und

Abbildung 5). *Tilletia lolioli* und *T. menieri* infizieren kein Kulturgetreide (Vánky, 2012). Mit diesem Test wurden alle an *Triticum* sp. gebildeten *T. controversa* Sporen positiv und alle gewöhnlichen Steinbrandarten (*T. caries* und *T. laevis*) nicht nachgewiesen. Erstmals liegen mit der hier beschriebenen qPCR und der oben beschriebenen LAMP spezifische Tests zum Nachweis von T. controversa vor, die an einer sehr großen Anzahl sowie einem breiten Spektrum an Proben (Arten und geografische Herkunft) entwickelt und überprüft wurden.

4.5.3.2 Quantitativer Nachweis

Um schließlich mit dem neu entwickelten Test neben dem qualitativen Nachweis von *T. controversa* Sporen auch deren Anzahl in einer Untersuchungsprobe bestimmen zu können, werden definierte Standards benötigt. Als Standard wurde in dieser Studie Plasmid-DNA verwendet, die das Zielfragment der *T. controversa* gDNA enthält. Die initiale Kopienzahl von 12,33 Mrd. Sporen in der Stocklösung wurde mittels MPN-PCR Methode ermittelt (siehe Tabelle 6). Zur Feststellung des MPN Indexes wurden zwei Varianten getestet. Variante 1 bezieht sich auf die letzten drei in der qPCR positiv amplifizierten Verdünnungsstufen. Variante 2 hingegen bezieht die erste nicht mehr amplifizierte Verdünnungsstufe mit ein. In diesem Fall liegt der Index in etwa um die Verdünnung 10^{-1} auseinander, was sich jedoch umgerechnet in die wahrscheinliche Sporenzahl als Unterschied von 170 Mio. Sporen in der Stocklösung auswirkt. Bei den darauffolgenden Tests mit definierten Sporensuspensionen traf die wahrscheinliche Sporenzahl der Variante 2 häufiger zu und wurde folglich als initiale Standardquantität festgelegt. In Tabelle 7 sind die davon ausgehend berechneten initialen Quantitäten der Standards zum zahlenmäßigen Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR angegeben.

Tabelle 6 Ermittlung der initialen Sporenzahl mittels MPN (most probable number) PCR.

Verdünnungs-stufe	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	MPN Index[b]	wahrscheinliche Kopienzahl[c]	wahrscheinliche Sporenzahl[d]
	Stichzahl[a]						in 1 µL Stocklösung [Mrd.]	
Variante 1	3	**3**	**1**	**1**	0	7,5	25,00	12,50
Variante 2	3	3	**1**	**1**	**0**	0,74	24,66	**12,33**

[a] Anzahl positiver PCR-Reaktionen eines Triplikates
[b] Ablesen des MPN Index aus der MPN-Tabelle
[c] Umrechnung anhand der höchsten des Indexes zugrunde liegenden Verdünnungsstufe
[d] Übertragung der ermittelten Kopienzahl (Plasmid, haploid) in die Sporenzahl (Spore, diploid)

Die qualitative Bewertung der mittels qPCR analysierten Standardgerade ergab bei Berücksichtigung der ersten drei erfolgreichen Tests ein R2 von 0,985 ± 0,011 bei einer Steigung von -3,37 ± 0,03 und somit eine Effizienz der qPCR Amplifikation von 97,94 ± 1,21 %. Die generierten Plasmid-DNA Standards wurden folglich zur Quantifizierung der untersuchten Sporensuspensionen mittels qPCR verwendet. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse einer Testreihe dargestellt, die den Bereich um den in Deutschland relevanten Grenzwert von 20 Sporen pro Korn (S/K) und Verdünnungen kleiner 5 S/K zur Ermittlung der Nachweisgrenze umfassen. Mittels qPCR werden in fast allen Stufen der reinen Sporensuspensionen die definierten Sporenmengen mit kleineren Schwankungen nachgewiesen. Hierbei ist zu beachten, dass für

die Bestimmung der Sporenzahl die Streuung um den Mittelwert berücksichtigt wird, da mittels qPCR immer Triplikate der untersuchten Probe analysiert werden. Die Testprobe, die gleichzeitig DNA von *T. controversa* und *T. caries* Sporen enthielt (OL16-20:AL15-20) sowie die künstlich infizierten Proben, bei denen die OL16 Sporen zuerst in eine Weizenprobe gemischt und anschließend nach dem Probenvorbereitungsprotokoll aufbereitet wurden (künst.inf.-20-x), konnten nur zu ca. 25-35 % des gezählten Referenzwertes (Filtrationsmethode) quantifiziert werden. Bei Vorliegen reiner *T. controversa* Sporen ist eine Bestimmung mittels qPCR erst ab 166,92 Sporen (0,39 S/K) möglich (Bestimmungsgrenze, LOQ (Limit of Quantification)). Die Verdünnung mit 81,32 Sporen (0,19 S/K) konnte nicht mehr ausreichend amplifiziert werden. Probe AL15-40 mit 40 S/K zeigt, dass *T. caries* mit diesem spezifischen qPCR Nachweis nicht detektiert wird.

Tabelle 7. Quantitäten der Plasmid-DNA Standards zum quantitativen Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR

	wahrscheinliche initiale Quantität			
Standard	[Sporen][a]	[Sporen/Korn][b]	Korrektur [S][c]	Korrektur [S/K][b]
S1	123.300	288,08	1.233.000	2880,84
S2	41.100	96,03	411.000	960,28
S3	13.700	32,01	137.000	320,09
S4	4.567	10,67	45.667	106,70
S5	1.522	3,56	15.222	35,57
S6	507	1,19	5.074	11,86
S7	169	0,40	1.691	3,95
S8	56	0,13	564	1,32

[a] mittels MPN-PCR ermittelte wahrscheinliche mittlere Sporenzahl

[b] Umrechnung der Quantität in Einheit Sporen pro Korn unter Annahme von 428 Körnern

[c] korrigierte Sporenzahl um Faktor 10 nach Testung künstlich infizierter Proben mit definierter Sporenzahl

Bei weiterer Testung künstlich infizierter Weizenproben mit unterschiedlichen Infektionsstärken wurde erneut eine viel zu geringe Quantifizierung der *T. controversa* Sporen festgestellt. Diese lag, bei fünf unabhängig untersuchten Testreihen, jeweils um den Faktor 10 unterhalb der eingesetzten Sporenmenge. Durch Korrektur der initialen Quantität der Standards um diesen Faktor 10 auf 1.233.000 Sporen für Standard S1 (siehe Tabelle 7) konnten korrekte Sporenzahlen für die künstlich infizierten Testproben, die als Simulation für die später untersuchten Routineproben aus der Saatgutuntersuchung dienten, ermittelt werden (siehe Abbildung 9). Beide als Negativkontrolle genutzten Testproben (T0 und T5) wurden durchgehend nicht amplifiziert. Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze ergab ein LOQ von 1,92 S/K, welches um das ca. fünf Fache höher liegt als bei der Analyse reiner *T. controversa* Sporen ohne Inhibitoren wie z.B. Fremd-DNA. Bei Annahme einer Selektivität von 95 %, bei der *T. controversa* Sporen-DNA bei Vorliegen potentiell störender Komponenten gerade noch zuverlässig nachgewiesen und quantifiziert werden kann, wurde eine Konzentration von 2,78 S/K als untere Nachweisgrenze (LOD, Limit of Detection) ermittelt.

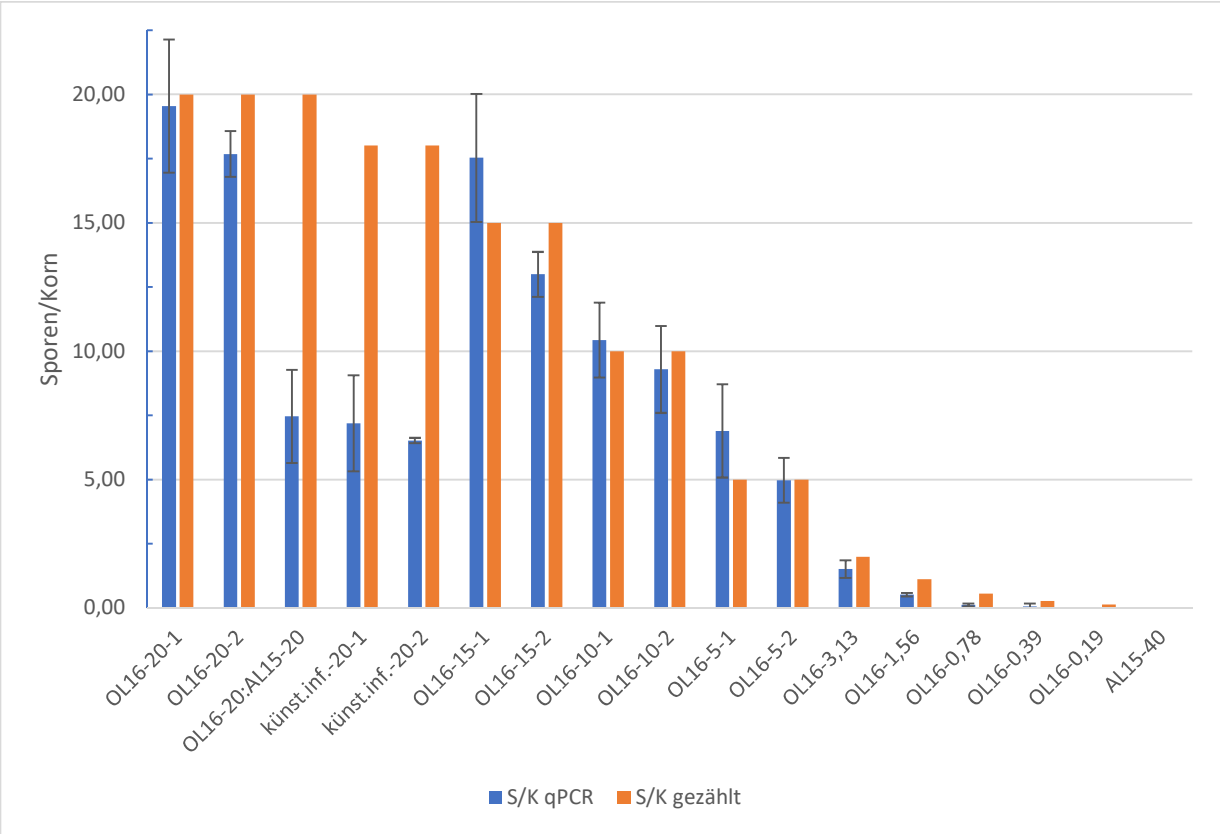

Abbildung 8. Nachweis von *T. controversa* Sporen-DNA mittels spezifischer qPCR. Quantifizierte Sporenanzahl pro Korn (S/K) des qPCR-Nachweises (blau), mittels Filtrationsmethode gezählte Sporenmenge (orange); OL16-20-x, OL16-15-x und folgende: DNA reiner Sporensuspensionen von Akzession *T. controversa* OL16 definiert in Höhe von 20, 15, 10, 5 (je Duplikate), 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 und 0,19 S/K; OL16-20:AL15-20: Mischung OL16 mit reiner Sporensuspension von Akzession *T. caries* AL15 im Verhältnis 20:20 S/K; AL15-40: nur AL15 in Höhe von 40 S/K

Alle Vorbereitungen und Entwicklungsschritte für einen quantitativen Nachweis von *T. controversa* waren erfolgreich. Mit den generierten Standards konnte in mehreren Wiederholungen eine Effizienz der Standardgerade sowie ein Bestimmtheitsmaß der Regression (R^2) mit annähernd den erwünschten optimalen Werten von Steigung -3,33, Effizienz 100 % und R^2 gleich 1, die auf eine optimale Verdoppelung der DNA-Moleküle in jedem Zyklus hinweist, erreicht werden. Dadurch konnten sowohl reine Sporensuspensionen als auch künstlich infizierte Weizenproben, nach Anpassung der initialen Quantität der Standards um den Faktor 10, korrekt quantifiziert werden (vgl. Abbildung 9). Die Abweichung der Werte bei künstlich infizierten Weizenproben sowie bei Vorhandensein von *T. caries* (vgl. Abbildung 8) ist auf die inhibitorische Wirkung vorliegender Fremd-DNA, die ebenfalls bei der Probenvorbereitung vom Weizenkorn abgewaschen und folgend extrahiert wird, zurückzuführen (Svec et al., 2015). Mit einer Bestimmungsgrenze (LOQ) von 195 Sporen (0,39 S/K) bei Analyse reiner *T. controversa* Sporen sowie einem LOQ von 823,13 Sporen (1,92 S/K) und einer unteren Nachweisgrenze (LOD) von 1.188,39 Sporen (2,78 S/K) bei Simulation natürlich infizierter Proben ist unser

neuentwickelter artspezifischer qPCR-Test zum Nachweis von *T. controversa* deutlich sensitiver als in bisherigen Studien beschrieben. Der qPCR Test von Zgraja et al. (2016) besitzt zwar ein LOQ von 1 S/K, ist aber nicht spezifisch. Liu et al. (2009) und Gao et al. (2010) können umgerechnet minimal 2.816,90 bzw. 1.549,30 *T. controversa* Sporen mittels PCR nachweisen. Die Angaben der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen können lediglich in Sporen und nicht in Konzentration der DNA angegeben werden, da nicht die reine DNA-Konzentration der *T. controversa* Sporen in den künstlich und später natürlich infizierten Untersuchungsproben bestimmt werden kann.

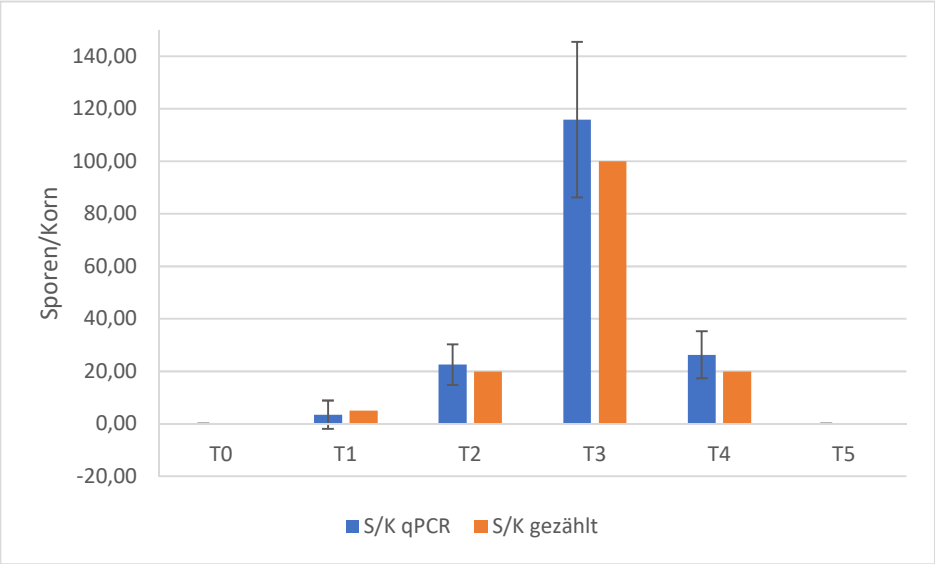

Abbildung 9. qPCR-Analyse von Testproben mit neu entwickelter Nachweismethode; Weizen künstlich infiziert mit *Tilletia* Sporen; 12 Replikate je Infektionsstufe; T0 0 S/K, T1 5 S/K, T2 20 S/K, T3 100 S/K *T. controversa*, T4 20:20 S/K *T. controversa*:*T. caries*, T5 40 S/K *T. caries*; initiale Quantität der verwendeten Standards zur Quantifizierung ermittelt durch MPN um Faktor 10 nach oben korrigiert

4.5.4 Eignungstest für den qPCR-Nachweis von *T. controversa* zum Überprüfen der Robustheit in anderen Laboren

Die im Entwicklungslabor ermittelte Spezifität und Sensitivität des neuen qPCR Nachweises wurde im Rahmen eines Eignungstests mit weiteren Laboren überprüft. Die vorherig beschriebenen Testproben zur Überprüfung der Quantitätsgenauigkeit wurden aus der Grundgesamtheit der künstlich infizierten Weizenproben gezogen, die dann auch für die Durchführung des Eignungstests verwendet wurden. Zehn dieser Proben wurden im Vorhinein einem Homogenitätstest unterzogen, der gleichmäßig verteilte cq-Werte ohne Ausreißer ergab. Zwei weitere Proben wurden hinsichtlich ihrer Stabilität am Ende der Eignungstestphase erneut überprüft und in die abschließende Bewertung des Homogenitätstest mit einbezogen. Auch hier konnten keine Ausreißer beobachtet werden. Die Sporen waren somit in den künstlich infizierten Weizenproben gleichmäßig homogen verteilt und stabil. Dadurch konnte das infizierte Material für die Überprüfung der neu entwickelten qPCR-Methode zum Nachweis von *T. controversa* in anderen Laboren als Untersuchungsprobe verwendet werden. In Abbildung 10 sind die

Ergebnisse der sieben am internationalen Eignungstest teilnehmenden Labore dargestellt. Die Labore berichteten die quantifizierte Sporenzahl pro Korn je untersuchter Probe mit der sich aus den Triplikaten ergebenden Streuung um den Mittelwert. Die Quantitäten zeigen deutlich, dass erhebliche Unterschiede bei der Analyse in den verschiedenen Laboren auftraten. Proben wurden teils zu gering, teils zu hoch quantifiziert und weiterhin wurden einzelne Proben, sowie die Negativkontrollen, falsch positiv amplifiziert. Die Standardgeraden der Labore wiesen Steigungen von -2,67 bis -3,69 auf und wichen somit in beide Richtungen vom Idealwert -3,33 ab.

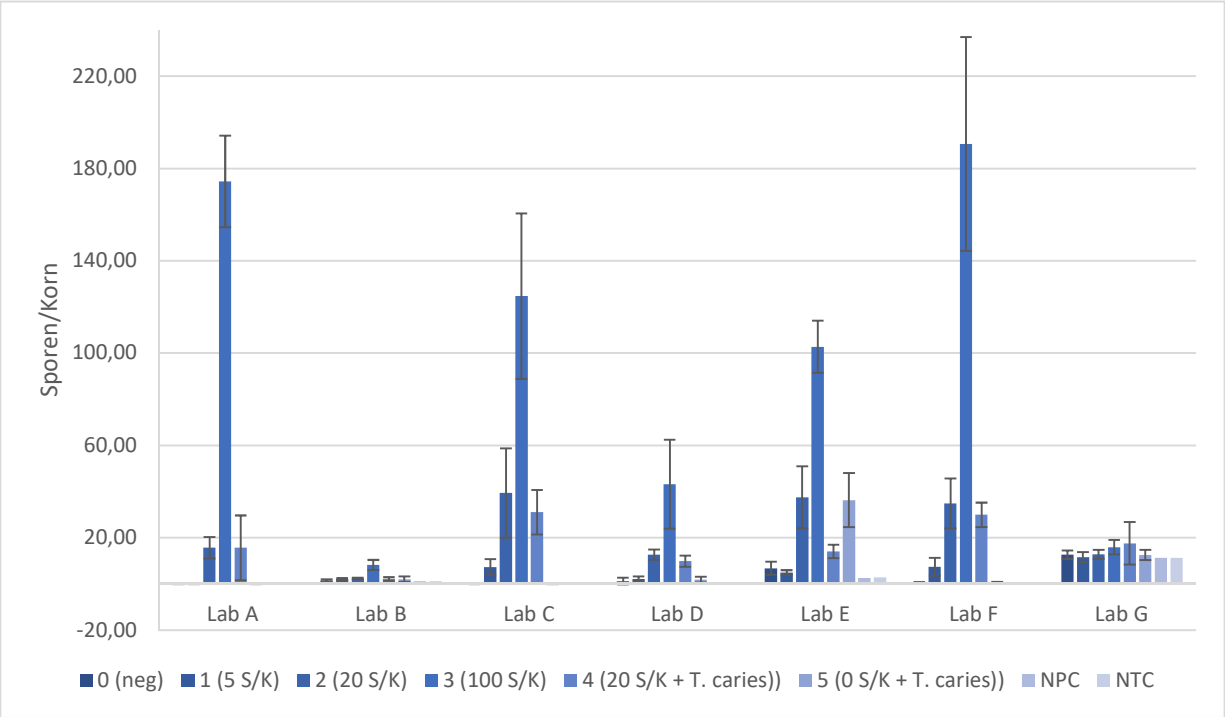

Abbildung 10. qPCR-Analyse von Testproben mit der neu entwickelten Nachweismethode in sieben verschiedenen, unabhängigen Laboren (Eignungstest); Weizen künstlich infiziert mit *Tilletia* Sporen;Triplikate je Infektionsstufe; Probe 0 0 S/K, 1 5 S/K, 2 20 S/K, 3 100 S/K *T. controversa*, 4 20:20 S/K *T. controversa*:*T. caries*, 5 40 S/K *T. caries*; NPC (negative process control, zum Ausschluss von Verunreinigungen während des gesamten Test-Ablaufs) und NTC (no template control, zum Ausschluss von Verunreinigungen in der qPCR-Analyse)

Die erste Protokollversion der neuen Nachweismethode war somit nicht geeignet um reproduzierbare Ergebnisse zwischen den sieben Laboren bei Verwendung unterschiedlicher Geräte zu erzielen. Ein spezifischer qualitativer Nachweis von *T. controversa* und somit eine Unterscheidung von *T. caries* mittels qPCR war jedoch weitestgehend möglich. Die vereinzelten falsch positiven Ergebnisse sind auf mehrere Faktoren im qPCR-Protokoll zurückzuführen, wie u.a. die Primer:Sonden-Konzentration, die Anzahl der Zyklen sowie eine unterschiedliche PCR-Effizienz der Standards im Vergleich zu den Analyseproben (Svec et al., 2015). Diese Faktoren führten auch dazu, dass keine exakte Quantifizierung der in den Proben künstlich definierten Sporenmengen möglich war. Bei einigen Laboren kann allerdings eine positive Tendenz der Analysewerte erkannt werden (Labor A, C, D und F). Weiterhin hatten die zwei Bautypen von Homogenisatoren, die im Eignungstest verwendet wurden vermutlich einen Einfluss auf

den erfolgreichen mechanischen Aufschluss der Sporen. Labore, die den Tissue Lyser II (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) oder die Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) verwendet haben, erzielten deutlich niedrigere DNA-Ausbeuten und folglich reduzierte Quantitäten in der qPCR Analyse. Dies kann auf eine zu geringe Krafteinwirkung des Gerätes in Kombination mit den verwendeten Keramik-Beads der Lysis-Tubes zurückgeführt werden. Mit dem FastPrep24 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) bzw. dem Precellys 24 (Bertin Technologies SAS, Frankreich) konnten höhere Quantitäten analysiert werden, die jedoch teilweise wiederum zu hoch waren, was mit der Verwendung nicht optimal eingestellter Standards erklärt werden kann. Die Standards für den Eignungstest waren in TE-Puffer gelöst. Für eine Quantifizierung von Umweltproben, wie sie hier als künstlich infizierte Weizenprobe vorliegt, wird empfohlen die Standard-DNA in einer spezifischen Matrix zu lösen. Durch die somit erfolgte Angleichung der PCR Effizienzen kann der negative Einfluss von Inhibitoren ausgeglichen werden (Svec et al., 2015). In wie fern die eingesetzten qPCR-Geräte einen Einfluss auf die Analyse-Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit der neuen Nachweismethode haben, konnte aufgrund der Datenlage nicht geklärt werden.

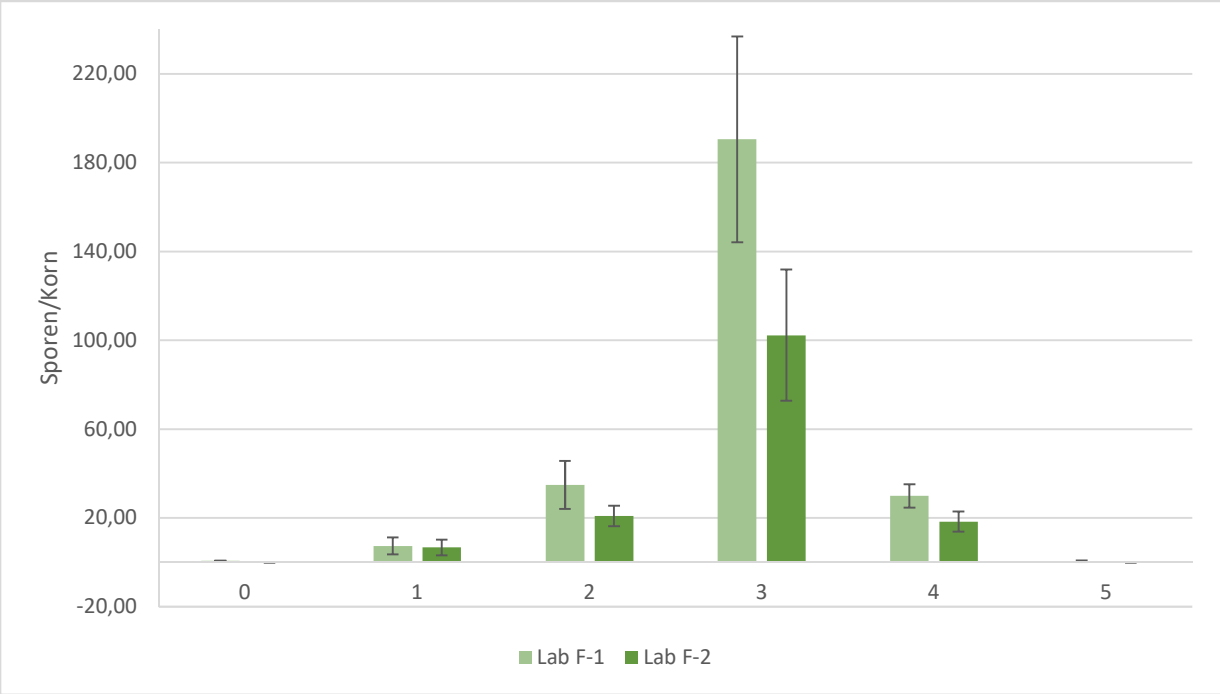

Abbildung 11. Vergleich der Ergebnisse der ersten qPCR-Analyse des Eignungstests (Lab F-1) mit der zweiten qPCR-Analyse nach Optimierung der Methode (Lab F-2) anhand der identischen Testproben; Weizen künstlich infiziert mit *Tilletia* Sporen; Triplikate je Infektionsstufe; Probe 0 0 S/K, 1 5 S/K, 2 20 S/K, 3 100 S/K *T. controversa*, 4 20:20 S/K *T. controversa*:*T. caries*, 5 40 S/K *T. caries*; NPC (negative process control) und NTC (no template control) in beiden Versionen negativ und somit nicht dargestellt

Der Eignungstest ist durch Nachbesserungen dennoch erfolgreich verlaufen. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden Schwachstellen der Methode aufgedeckt und konnten im weiteren Verlauf optimiert werden. Im Detail wurde die Primer:Sonden-Konzentration des qPCR-Mastermix verändert sowie das

qPCR-Protokoll auf ein 3-Schritt Programm mit reduzierter Zyklenzahl angepasst. Zudem wurde die Plasmid-DNA der Standards in einer speziell angefertigten Matrix gelöst und die Verdünnungsschritte auf ein Verhältnis von 1:3 reduziert. Durch diese Optimierungsschritte wurden keine falsch positiven Amplikons mehr detektiert. Weiterhin verbesserte sich die Quantifizierung erheblich und es konnten in einem Labor (Lab F) die vordefinierten Sporenmengen der künstlich infizierten Eignungstestproben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Auch mit der DNA, die in den übrigen sechs teilnehmenden Laboren im Rahmen des Eignungstests generiert wurde, wurden Wiederholungsanalysen mit der optimierten Methode durchgeführt. Jedoch konnten diese Ergebnisse zu keinen weiteren Schlussfolgerungen herangezogen werden, da sie zumeist falsch negativ waren. Aufgrund der teils sehr niedrigen DNA-Konzentrationen muss vermutet werden, dass sich im Verlauf der Zeit bis zur erneuten Testung der Proben nach Optimierung der Nachweismethode die DNA denaturiert hatte und somit nicht mehr ausreichend amplifiziert werden konnte. Eine vollständige Wiederholung des Eignungstests war aufgrund der verfügbaren Ressourcen nicht möglich. Die erfolgreiche Optimierung der Methode wurde folgend intern an Routineproben der Saatgutuntersuchung überprüft und bestätigt.

4.5.5 Praktische Anwendung der qPCR-Methode an Routineproben

Insgesamt wurden 64 Routineproben aus der Saatgutuntersuchung im Zeitraum von Ende Juli bis Anfang Oktober 2019 mit der neu entwickelten qPCR-Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *T. controversa* an Weizensaatgut analysiert. Als Referenz diente die optimierte Filtrationsmethode der Beschlusssammlung der Fachgruppe Saatgut im VDLUFA (Schumann et al., 2016), wie sie standardmäßig an allen eingesendeten Untersuchungsproben an der LfL durchgeführt wird. Beim

Tabelle 8. Gruppierung der 64 untersuchten Routineproben bezogen auf ihre Abweichung der ermittelten Sporenzahl mittels qPCR-Methode im Vergleich zur Filtrationsmethode in Prozent

Abweichung [%]	Anzahl Proben (N=64)
0 ≤ x ≤ 5	30
5 < x ≤ 10	4
10 < x ≤ 25	8
25 < x ≤ 50	8
50 < x ≤ 75	9
75 < x ≤ 100	5

Vergleich der Ergebnisse beider Methoden konnte festgestellt werden, dass über die Hälfte der untersuchten Proben (N=34) lediglich eine Abweichung von bis zu 10 % aufwiesen, wobei sogar 30 Proben lediglich um 0 bis 5 % voneinander abwichen (siehe Tabelle 8). Ein Unterschied der ermittelten Sporenzahlen von über 50 % wurde nur bei weniger als einem Viertel der Proben (N=14) festgestellt. In Tabelle 9 wurde die Übereinstimmung der Ergebnisbewertung hinsichtlich der in Deutschland geltenden Grenzwerte dargestellt. Insgesamt wurden nur drei der 64 Proben an den Grenzwerten unterschiedlich quantifiziert. Bei diesen drei Proben wurde mittels qPCR eine um 33 bis 70 % höhere Sporenzahl bestimmt als mit der Filtrationsmethode. In Zahlen ist dies ein Unterschied von 9,43 bis 17,78 Sporen pro Korn, der dazu führt, dass das qPCR-Ergebnis oberhalb und das Filtrationsergebnis unterhalb des

Grenzwertes von 20 S/K liegt. Alle weiteren Proben wiesen innerhalb der relevanten Bereiche eine Übereinstimmung auf. Lediglich drei weitere Proben mit einem Filtrationsergebnis von 0,2 bis 0,4 S/K *T. controversa* wurden mittels qPCR nicht nachgewiesen.

Tabelle 9. Bewertung der mittels qPCR- und Filtrationsmethode ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der in Deutschland geltenden Grenzwerte von 20 und 100 S/K (N=64)

qPCR Sporenzahl [S/K]	Filtrationsmethode [Anzahl Proben]		Abweichung	Differenz [S/K]
	gleich bestimmt	ungleich bestimmt		
x = 0	24	3	qPCR < Filtration	0,2 / 0,2 / 0,4
0 < x ≤ 20	16	0		
20 < x ≤ 100	5	3	qPCR > Filtration	9,43 / 14,81 / 17,78
x > 100	13	0		

Mit einem ermittelten LOQ von 1,92 S/K und einem LOD von 2,78 S/K ist ein Nachweis von 0,2 bzw. 0,4 S/K *T. controversa* nicht möglich. Ausgehend vom LOD und der Annahme, dass nur eine qPCR-Reaktion eines Triplikates positiv amplifiziert wird, können derzeit rechnerisch minimal 0,92 S/K *T. controversa* spezifisch in einer Untersuchungsprobe nachgewiesen werden. Der kleinste tatsächlich ermittelte Wert bei Analyse der Routineproben war 0,72 S/K und das ist der derzeit sensitivste spezifische Nachweis von *T. controversa* an Weizensaatgut (Zgraja et al., 2016).

Unter Berücksichtigung des rechnerischen LOD von 0,92 S/K war es in dieser Studie möglich, mit der neu entwickelten qPCR-Methode, *T. controversa* an natürlich infiziertem Weizensaatgut zu 100 % spezifisch nachzuweisen. Zudem enthielten die als negativ bestimmten Proben bis zu 20.000 Sporen des Steinbrandes *T. caries* und kamen aus unterschiedlichen Regionen, wodurch die Spezifität des *T. controversa* qPCR-Nachweises zusätzlich bestätigt wurde. Bei über 95 % der in dieser Studie untersuchten Saatgutproben kamen die qPCR sowie die Filtrationsmethode hinsichtlich der Bewertung anhand der in Deutschland geltenden Grenzwerte (AG-AKST, 2015) auf das gleiche Ergebnis. Lediglich bei drei Proben kam es zu Abweichungen, bei denen das Ergebnis der Filtrationsmethode unterhalb und das qPCR-Ergebnis oberhalb der 20 S/K Grenze lag. Es ist keine gesicherte Aussage darüber möglich, welches der Ergebnisse das korrekte ist. Wie anfangs beschrieben ist die morphologische Bestimmung der *Tilletia*-Arten auf dem Filter mitunter herausfordernd, zudem wurde bei der Filtrationsmethode nur ein Replikat der Probe untersucht. Andererseits wurden bei der qPCR Analyse Streuungen um den Mittelwert von 3,5 bis 300 % (Median 15,94 %) festgestellt. Diese Streuung müsste im weiteren Verlauf weiter reduziert werden. Eine Möglichkeit wäre die Erhöhung der eingesetzten Probenmenge, da die Streuung bei Sporenmengen bis 20 S/K am höchsten ist und somit die DNA-Konzentration je qPCR Reaktion gesteigert werden könnte. Dies hätte möglicherweise auch einen positiven Einfluss auf LOD und LOQ, da kleinere Sporenmengen nachzuweisen wären. Derzeit ist die qPCR Methode zum Nachweis von *T. controversa* noch nicht geeignet um Entscheidungen bezüglich bestehender Quarantänebestimmungen treffen zu können. Hierfür müsste eine einzelne Spore, ein einzelnes Molekül nachgewiesen werden. Für eine höhere Sensitivität eignet sich die droplet digital PCR (ddPCR), wie sie im Bereich des *Tilletia* Sporen Nachweises im Boden von Liu et al., 2020 entwickelt und getestet wurde. Bei

Verwendung der identischen Primer wie für die qPCR lassen die Ergebnisse auf eine vierfach höhere Sensitivität der ddPCR schließen.

5 Diskussion (siehe 4.)

6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen des Forschungsvorhabens entwickelten molekularbiologischen Methoden zum spezifischen Nachweis von *T. controversa* mittels LAMP (qualitativ an Sporenmaterial aus der Brandbutte) und qPCR (qualitativ wie quantitativ auch an Routineproben aus der Saatgutuntersuchung) können künftig nach weiteren Optimierungsschritten und Validierungen von den nationalen (VDLUFA) und internationalen (ISTA) Saatgutlaboren für die Gesundheitsprüfung von Saatgut – zusätzlich zur Filtrationsmethode – eingesetzt, sowie von weiteren Untersuchungsstellen wie den Pflanzenschutzämtern genutzt werden. Um bei steigenden Untersuchungszahlen in der Saatgutuntersuchung die Ergebnisse weiterhin qualitativ hochwertig und zeitgerecht zur Verfügung stellen zu können sind effektive, robuste und exakte sowie mehr personenunabhängige Untersuchungsmethoden notwendig. Die im Projekt entwickelten molekularbiologischen Nachweismethoden haben gegenüber der gegenwärtig angewandten Filtrationsmethode zwei entscheidende Vorteile: Sie können im größeren Maßstab parallelisiert werden und erlauben somit einen wesentlich größeren Probendurchsatz pro Zeiteinheit. Außerdem kann jeder Mitarbeiter mit molekularbiologischer Ausbildung schnell in diese Analysen eingewiesen werden und diese nach Protokoll durchführen. Die vorliegenden Erkenntnisse und entwickelten Protokolle können somit effektiv zur Produktion gesunden Saatgutes beitragen. Das Ziel der Harmonisierung von Methoden und der damit einhergehenden Vergleichbarkeit von Ergebnissen in der Gesundheitsuntersuchung wird damit erreicht.

In Deutschland gilt für das Inverkehrbringen von Saatgut der Schwellenwert von 20 Sporen pro Korn. Saatgut mit einem *Tilletia*-Sporenbesatz von 20 – 100 Sporen pro Korn darf nur nach entsprechender Behandlung in Verkehr gebracht werden. Bei konventionellem Saatgut ist eine Beizauflage vorgegeben, bei ökologisch erzeugtem Saatgut muss eine geeignete Saatgutbehandlung wie z.B. das Bürsten des Saatguts erfolgen (https://www.ag-akst.de/anerkennung-von-saat-und-pflanzgut-in-deutschland.html).

Darüber hinaus tragen die generierten Genomsequenzen und die darauf basierende Mikrosatelliten-Marker-gestützte Untersuchung der genetischen Vielfalt der natürlichen Populationen des Stein- und Zwergsteinbrandes entscheidend zur Verbesserung des allgemeinen Kenntnisstandes über die Pathogene bei. Diese Ergebnisse können für eine zielgerichtetere Züchtung widerstandfähiger Sorten genutzt werden. Seitens der Ökozüchtung besteht großes Interesse diese Erkenntnisse in die Züchtung einfließen zu lassen, da unter anderem auch durch die Zunahme des ökologischen Landbaues großer Bedarf an weniger anfälligen Sorten hinsichtlich der Brandkrankheiten besteht. Von den Ökoverbänden

wird seit langem gefordert das Merkmal Brandanfälligkeit als weiteres Kriterium bei der Sortenzulassung beim Bundessortenamt mit aufzunehmen.

Sämtliche im Projekt erstellten Genomdaten werden in die Gen-Datenbank des European Nucelotide Archive (ENA) eingestellt und zur amerikanischen GenBank des NCBI gespiegelt. Duplikate der 11, im Rahmen des Genomsequenzierungsprojekts verwendeten Isolate, wurden im Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS), Niederlande, als lebende Kulturen zur Nutzung für andere Forschungsprojekte hinterlegt. Zusätzlich stehen 54 Einzel-Teliospor-Kulturen von *T. caries*, *T. laevis*, und *T. controversa* und die in der Stammsammlung des JKI als Dauerkulturen in flüssigem Stickstoff gelagert werden, für weitere Untersuchungen bereit.

Die Methoden sowie Ergebnisse werden als Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften der Fachöffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

Folgende Publikationen sind in Arbeit (vorläufige Titel):

"Genome sequencing of *Tilletia caries*, *T. laevis,* and *T. controversa* causal agents of common and dwarf bunt of wheat provide first insights into their inter- intra species genomic diversity"

"Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Tilletia controversa* based on genome comparisons"

"Study of *T. controversa* species limit using multilocus phylogeny"

"Discrimination of the wheat bunt fungi *Tilletia caries*, *T. laevis* and *T. controversa* by MALDI-TOF MS of teliospores"

"Development of a qPCR method for the detection and quantification of *Tilletia controversa* based on genome comparisons"

"Detection and quantification of *Tilletia controversa* by qPCR: A practical approach for seed testing applications"

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Geplantes Ziel laut Vorhabensbeschreibung	**Tatsächlich erreicht**	**Nicht erreicht**	**Ergänzung/Begründung**
Evaluierung veröffentlichter Primer, die für die Entwicklung von molekularbiologischen Nachweismethoden von Brandpilzen verwendet werden können	Es wurden alle zum Zeitpunkt des Projektstarts sowie während der Projektlaufzeit publizierten Primer, mit Schwerpunkt auf den Nachweis von *Tilletia* spp. bioinformatisch und im Labor überprüft.	---	Die publizierten Primer erwiesen sich in unseren Tests als nicht spezifisch. Das Ergebnis dieser Evaluierung erforderte eine vollständig neue Suche und Entwicklung von Markern zur Erreichung der Projektziele.
Gesamtgenomsequenzierung („low coverage“ mittels Illumina-Technik) für die Mikrosatelliten-Entwicklung der Populationsuntersuchungen	Die Gesamtgenome von 11 Isolaten von *T. caries*, *T. laevis, T. controversa*, die mittels der Illumina-Technik sequenziert wurden, konnten erfolgreich für die Entwicklung von Mikrosatelliten genutzt werden.	---	---
Erstellen eines qualitativ hochwertigen Gesamtgenoms von *T. controversa* mittels PacBio-Sequenzierung (hohe Qualität, lange DNA-Sequenzen) für die Entwicklung spezifischer Marker zur Detektion von *T. controversa*	Das mittels PacBio sequenzierte qualitativ hochwertige Gesamtgenom von *T. controversa* ermöglichte auch eine bessere Analyse der Illumina-Genome, insbesondere das Auffinden spezifischer Genombereiche für die Testentwicklung (qPCR, LAMP) zum Nachweis von *T. controversa*.	---	Die Sequenzierung war in diesem Umfang nicht geplant und auch nicht vorhersehbar, wurde aber im Projektverlauf zur Erreichung der weiteren Ziele notwendig. Die hierfür zusätzlich benötigten Finanzmittel wurden dankenswerterweise von der BLE bereitgestellt.
qPCR Methodenentwicklung zum Nachweis von *T. controversa* (qualitativ und quantitativ)	Im Teilprojekt der LfL wurde eine qPCR Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis spezifisch für Zwergsteinbrand (*T. controversa*) entwickelt.	---	---

Geplantes Ziel laut Vorhabensbeschreibung	**Tatsächlich erreicht**	**Nicht erreicht**	**Ergänzung/Begründung**
Validierung des qPCR Nachweises von *T. controversa*	Der Test wurde intern umfangreich hinsichtlich seiner Spezifität (auch gegen typische Getreidepilze), seiner Sensitivität, sowie abschließend in einem internationalen Eignungstest auf seine Robustheit überprüft.	Eine abschließende Methodenvalidierung konnte noch nicht erfolgen.	Ein weiterer Eignungstest nach den Validierungsvorgaben der ISTA und/oder EPPO ist noch notwendig, um den optimierten Test abschließend in die entsprechenden Methodenbücher aufnehmen und international anwenden zu können.
Entwicklung und Validierung eines Multiplexnachweises mittels qPCR für *T. caries* und *T. controversa*	Der Nachweis von *T. controversa* wurde so entwickelt, dass generell eine Anwendung in einem Multiplexnachweis möglich ist (sondenbasierter qPCR Nachweis).	Ein Multiplexnachweis konnte noch nicht entwickelt werden.	Nachdem im Projektzeitraum kein Test zum Nachweis von *T. caries* entwickelt werden konnte, war die Entwicklung eines Multiplexnachweises nicht möglich.
LAMP Methodenentwicklung *T. controversa* (Schnelltest)	Im Teilprojekt des JKI wurde ein LAMP-basierter Schnelltest zum spezifischen qualitativen Nachweis von *T. controversa* entwickelt.	---	---
Validierung des LAMP Nachweises für *T. controversa*	Der Test wurde intern umfangreich hinsichtlich seiner Spezifität (auch gegen typische Getreidepilze), seiner Sensitivität, sowie abschließend in einem nationalen Eignungstest überprüft.	Eine Validierung des Tests an Saatgutproben steht noch aus.	---
Methodenentwicklung und Validierung des Nachweises für *T. caries* (und *T. laevis*) (qPCR und LAMP)	---	Eine Methode zum spezifischen Nachweis von *T. caries* (und *T. laevis*) konnte abschließend nicht entwickelt werden.	Durch die Genomvergleiche wurden spezifische Genomregionen gefunden, auf denen die weitere Testentwicklung aufgebaut werden kann.

Geplantes Ziel laut Vorhabensbeschreibung	**Tatsächlich erreicht**	**Nicht erreicht**	**Ergänzung/Begründung**
Methodenentwicklung und Validierung des Nachweises für *T. indica* und *Ustilago nuda* (qPCR und LAMP)	---	Es wurden keine Methoden entwickelt.	Im Projekt wurde der Fokus auf den Nachweis der in Deutschland und Europa vorkommenden *Tilletia* Arten begrenzt. Die Testentwicklung für *U. nuda* hätte sich aufgrund der verschiedenartigen Biologie der Pathogene deutlich unterschieden. Weiterhin wurde im Projektzeitraum bekannt, dass sich andere internationale Forschungsgruppen mit Analysen zu *T. indica* beschäftigen.
Populationsstudien zu *T. caries* und *T. controversa* - *Markerentwicklung (Mikrosatelliten)* - Populationsstudie - Forschungsfragen zu Hybridisierung der Arten bzw. geographischem Signal	Es konnten erfolgreich 24 Mikrosatelliten Marker für die Untersuchung von *T. caries, T. laevis und T. controversa* entwickelt werden. Eine umfangreiche erste Populationsstudie wurde durchgeführt. Bislang gab es dabei jedoch keine Hinweise auf einen hybridogenen Ursprung einzelner Isolate, noch auf ein starkes geographisches Signal.	---	---
Publikationen	Wissenschaftliche Publikationen waren zum Zeitpunkt der Berichtslegung in Arbeit.		

8 Zusammenfassung

Der Steinbrand des Weizens wird verursacht durch *Tilletia caries* und *T. laevis*, der Zwergsteinbrand durch *T. controversa*. Die weltweit verbreiteten Pathogene können insbesondere im ökologischen Landbau enormen Schaden bei Ernte- und Saatgut verursachen. Deshalb unterliegen die samen- und bodenbürtigen Erreger je nach Land verschiedenen phytosanitären bzw. Quarantäne-Regulierungen. Für die Produktion von Saatgut und den internationalen Weizenhandel sind in einer Reihe von Ländern bestimmte Schwellenwerte der maximal zulässigen Sporenbelastung vorgeschrieben. In Deutschland liegt der relevante Wert bei 20 *Tilletia*-Sporen pro Korn. Die gegenwärtig verwendete Nachweismethode zur Bestimmung der Pathogene bzw. der Sporenbelastung des Weizensaatgutes beruht auf einer zeitaufwändigen Filtrationsmethode mit anschließender Mikroskopie und Auszählung der Sporen, die eine langjährige individuelle Erfahrung der Saatgutanalysten bedarf. Deshalb sollten im Projekt mehr personenunabhängige, effiziente molekularbiologische Methoden entwickelt werden, die das Potenzial haben diese aufwändige Methode mittelfristig zu ersetzen. Es wurden hierfür zwei Ansätze gewählt: (1) Die Entwicklung einer Sonden-basierten qPCR-Methode für den Nachweis und die direkte Quantifizierung der *Tilletia*-Arten und (2) ein LAMP-Test für den schnellen qualitativen Nachweis der Arten mittels Farbumschlag.

Für die Entwicklung dieser Methoden wurden elf Gesamtgenome der drei sehr nah verwandten *Tilletia*-Arten sequenziert. Durch die bioinformatische Analyse dieser Genome und den Vergleich mit zehn weiteren vor kurzem veröffentlichten Genomen konnten geeignete Regionen für die Markerentwicklung von *T. controversa* und *T. caries*/*T. laevis* detektiert werden. Daraufhin wurden Primer und Protokolle für den spezifischen Nachweis von *T. controversa* entwickelt und an über 200 Isolaten der drei Arten und weiteren pilzlichen Pflanzenpathogenen getestet. *Tilletia controversa* kann mittels LAMP und qPCR spezifisch nachgewiesen und sicher von den Steinbrandarten *T. caries* und *T. laevis* sowie weiteren Brandpilzen und Getreidepathogenen unterschieden werden. Bei der LAMP-Methode erfolgte der qualitative Nachweis über einen Farbumschlag in der Reaktionslösung. Die Überprüfung des entwickelten LAMP-Nachweises wurde in einem Eignungstest mit Laboren verschiedener Pflanzenschutzdienste für isolierte DNA aus Teliosporen und Pilzkulturen durchgeführt. Der Test war in den verschiedenen Laboren robust und die untere Nachweisgrenze von 5pg Pilzbiomasse konnte in allen fünf teilnehmenden Laboren reproduziert werden. Mit der Sonden-basierten qPCR-Methode kann *T. controversa* qualitativ sowie quantitativ an reinem Sporenmaterial sowie an Weizenkörnern nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze des Tests liegt mit 2,78 S/K, bzw. rechnerisch mit 0,92 S/K, bei Analyse von Triplikaten, deutlich unterhalb des in Deutschland relevanten Grenzwertes von 20 S/K. Mit einem internationalen Eignungstest wurden bestehende Schwachstellen des Tests aufgedeckt. Nach Optimierung dieser Teilaspekte war die Methode deutlich robuster, wodurch ein Vergleichstest mit der bestehenden Filtrationsmethode (Referenzmethode) an ausgewählten Proben möglich wurde. Der qPCR-Test konnte erfolgreich an einer Auswahl von 64 Saatgutproben aus der regulären Saatgutuntersuchung (Routineproben) überprüft werden. Bei 61 dieser Proben kam es zu übereinstimmenden Ergebnissen zwischen der qPCR Methode und der Referenzmethode. Lediglich bei drei Proben wurden für die Bewertung hinsichtlich der in Deutschland geltenden Vorgaben relevante Abweichungen festgestellt.

Die Genomanalysen lieferten erste Einblicke in die genomische Struktur und Diversität von *T. caries*, *T. laevis* und *T. controversa*. Die ermittelte Ähnlichkeit zwischen den drei Arten ist außergewöhnlich hoch. Insbesondere die beiden Arten *T. caries* und *T. laevis* verhalten sich auf genomischer Ebene eher wie eine Art. Basierend auf diesen Daten wurden 41 Mikrosatellitenmarker entwickelt und an über 200 Proben von *T. caries*, *T. controversa* und *T. laevis* auf diese Loci getestet. Die Marker wurden anschließend für populationsgenetische Untersuchungen genutzt. Diese zeigten unter anderem auf, dass *T. controversa*-Isolate von Weizen zusammen mit *T. secalis* von Roggen eine Population bilden, wohingegen *T. controversa*-Isolate von Wildgräsern aus mehreren distinkten Populationen bestehen. Wildgräser spielen somit wahrscheinlich keine Rolle als Wirts-Reservoir für Infektionen von Weizen durch *T. controversa*. Die Ergebnisse der populationsgenetischen Untersuchungen deuten auch darauf hin, dass es keine Korrelation zwischen der geographischen Herkunft der Proben und der Gruppierung der verschiedenen Isolate bei einer der drei *Tilletia*-Arten gibt.

Die im Rahmen dieses Projektes entwickelten molekularbiologischen Methoden zum spezifischen Nachweis von *T. controversa* mittels qPCR und LAMP sind derzeit die sensitivsten und die am umfassendsten überprüften Methoden. Die generierten Genomdaten und -analysen, sowie die Untersuchung der genetischen Vielfalt der natürlichen Populationen des Stein- und Zwergsteinbrandes tragen zudem entscheidend zur Verbesserung des allgemeinen Kenntnisstandes über diese Pathogene bei. Dieses Wissen kann auch für die zielgerichtete Züchtung widerstandsfähiger Getreidesorten genutzt werden.

9 Literaturverzeichnis

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

AG-AKST. (2015). *Erforderliche Gesundheitsprüfungen im Rahmen der amtlichen Anerkennung von Saatgut* (p. 5). Arbeitsgemeinschaft der Anerkennungsstellen für Landwirschaftliches Saat- und Pflanzgut in Deutschland.

Aydoğdu M., Kaya Y. (2020) Reactions of spring wheat varieties to common bunt (*Tilletia laevis*) in Turkey. Cereal Research Communications. DOI: 10.1007/s42976-020-00040-1.

Carris L. (2008) Is rye bunt, *Tilletia secalis*, present in North America? North American Fungi 3:147-159. DOI: 10.2509/naf2008.003.0078.

Carris L.M., Castlebury L.A., Huang G., Alderman S.C., Luo J., Bao X. (2007) *Tilletia vankyi*, a new species of reticulate-spored bunt fungus with non-conjugating basidiospores infecting species of *Festuca* and *Lolium*. Mycol Res 111:1386-98. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.09.008.

Cunningham J.L. (1972) A Miracle Mounting Fluid for Permanent Whole-Mounts of Microfungi. Mycologia 64:906-911. DOI: 10.2307/3757946.

Dumalasová V., Leišová-Svobodová L., Bartoš P. (2014) Common bunt resistance of Czech and European winter wheat cultivars and breeder lines. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50:201-207. DOI: 10.17221/241/2013-cjgpb.

Durán R., Fischer G.W. (1961) The genus *Tilletia* Washington State University, [Pullman, Wash.].

Ebert, V., Neumann, C., Pichler-Wallace, A., Schocher, I., & Stacher, C. (2013). Skriptum Mikrobiologisches Labor Teil-B : Methoden. In Kompendium für Biochemie, angewandte Mikrobiologie, & Gentechnik (pp. 1–34).

Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat Rev Genet 5:435-45. DOI: 10.1038/nrg1348.

Felsenstein, J. (1989). PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Ver. 3.2). Cladistics, 5, 164-166

Gao L., Chen W., Liu T. (2011) An ISSR-based Approach for the Molecular Detection and Diagnosis of Dwarf Bunt of Wheat, Caused by *Tilletia controversa* Kühn. Journal of Phytopathology 159:155-158. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01735.x.

Gao L., Chen W.Q., Liu T.G. (2010) Development of a SCAR marker by inter-simple sequence repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* KÜHN. Folia Microbiol (Praha) 55:258-64. DOI: 10.1007/s12223-010-0038-1.

Gao L., Feng C., Li B., Liu T., Liu B., Chen W. (2015) Detection of *Tilletia controversa* using immunofluorescent monoclonal antibodies. J Appl Microbiol 118:497-505. DOI: 10.1111/jam.12703.

Gao Y., Tan M.K., Zhu Y.G. (2016) Rapid and specific detection of *Tilletia indica* using loop-mediated isothermal DNA amplification. Australasian Plant Pathology 45:361-367. DOI: 10.1007/s13313-016-0422-7.

García-Bernalt Diego J., Fernández-Soto P., Crego-Vicente B., Alonso-Castrillejo S., Febrer-Sendra B., Gómez-Sánchez A., Vicente B., López-Abán J., Muro A. (2019) Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Schistosoma mansoni DNA: towards a ready-to-use test. Scientific Reports 9:14744. DOI: 10.1038/s41598-019-51342-2.

Goates B.J. (1996) Common Bunt and Dwarf Bunt, in: R. D. Wilcoxson and E. E. Saari (Eds.), Bunt and Smut Diseases of Wheat; Concepts and Methods of Disease managment, CIMMYT, Mexico.

Gurjar M.S., Aggarwal R., Jogawat A., Kulshreshtha D., Sharma S., Solanke A.U., Dubey H., Jain R.K. (2019) De novo genome sequencing and secretome analysis of *Tilletia indica* inciting Karnal bunt of wheat provides pathogenesis-related genes. 3 Biotech 9:219. DOI: 10.1007/s13205-019-1743-3.

Hoff K.J., Lange S., Lomsadze A., Borodovsky M., Stanke M. (2015) BRAKER1: Unsupervised RNA-Seq-Based Genome Annotation with GeneMark-ET and AUGUSTUS. Bioinformatics 32:767-769. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv661.

Hoffmann J.A., Metzger R.J. (1976) Current status of virulence genes and pathogenic races of the wheat bunt fungi in the northwestern USA. Phytopathology 66:4.

International Seed Testing Association, I., 1984: Working Sheet No. 53, *Triticum aestivum, Tilletia contraversa* Kühn, *Tilletia caries* (DC) Tul., *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro. In: *ISTA Handbook on Seed Health Testing*. Zürich, Schweiz, International Seed Testing Association.

Josefsen L., Christiansen S.K. (2002) PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*. Mycological Research 106:1287-1292. DOI: 10.1017/S0953756202006603.

Keilwagen J., Wenk M., Erickson J.L., Schattat M.H., Grau J., Hartung F. (2016) Using intron position conservation for homology-based gene prediction. Nucleic Acids Res 44:e89. DOI: 10.1093/nar/gkw092.

Kochanova M., Zouhar M., Prokinova E., Rysanek P. (2004) Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. Plant Soil and Environment 50:75-77. DOI: 10.17221/3684-Pse.

Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. Genome Res 27:722-736. DOI: 10.1101/gr.215087.116.

Levin H.L., Moran J.V. (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. Nature Reviews Genetics 12:615-627. DOI: 10.1038/nrg3030.

Liu J., Li C., Muhae-Ud-Din G., Liu T., Chen W., Zhang J., Gao L. (2020) Development of the Droplet Digital PCR to Detect the Teliospores of Tilletia controversa Kühn in the Soil With Greatly Enhanced Sensitivity. Frontiers in Microbiology 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00004.

Liu J.H., Gao L., Liu T.G., Chen W.Q. (2009) Development of a sequence-characterized amplified region marker for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kuhn. Lett Appl Microbiol 49:235-40. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02645.x.

Lowther C.V. (1950) Chlamydospore germination in physiologic races of Tilletia caries and Tilletia foetida. Phytopathology 40:590-603 pp.

Ma L.-J., van der Does H.C., Borkovich K.A., Coleman J.J., Daboussi M.-J., Di Pietro A., Dufresne M., Freitag M., Grabherr M., Henrissat B., Houterman P.M., Kang S., Shim W.-B., Woloshuk C., Xie X., Xu J.-R., Antoniw J., Baker S.E., Bluhm B.H., Breakspear A., Brown D.W., Butchko R.A.E., Chapman S., Coulson R., Coutinho P.M., Danchin E.G.J., Diener A., Gale L.R., Gardiner D.M., Goff S., Hammond-Kosack K.E., Hilburn K., Hua-Van A., Jonkers W., Kazan K., Kodira C.D., Koehrsen M., Kumar L., Lee Y.-H., Li L., Manners J.M., Miranda-Saavedra D., Mukherjee M., Park G., Park J., Park S.-Y., Proctor R.H., Regev A., Ruiz-Roldan M.C., Sain D., Sakthikumar S., Sykes S., Schwartz D.C., Turgeon B.G., Wapinski I., Yoder O., Young S., Zeng Q., Zhou S., Galagan J., Cuomo C.A., Kistler H.C., Rep M. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. Nature 464:367-373. DOI: 10.1038/nature08850.

Mäntynen V., Niemelä S., Kaijalainen S., Pirhonen T., Lindström K. (1997) MPN-PCR-quantification method for staphylococcal enterotoxin c1 gene from fresh cheese. International journal of food microbiology 36:135-143. DOI: 10.1016/s0168-1605(97)01243-9.

Matanguihan J.B., Murphy K.M., Jones S.S. (2011) Control of Common Bunt in Organic Wheat. Plant Dis 95:92-103. DOI: 10.1094/PDIS-09-10-0620.

Meiners J.P. (1959) Methods of Infecting Wheat with the Dwarf Bunt Fungus. Phytopathology 49:4-8.

Meiners J.P., Waldher J.T. (1959) Factors Affecting Spore Germination of 12 Species of Tilletia from Cereals and Grasses. Phytopathology 49:724-728.

Mishra P., Maurya R., Gupta V.K., Ramteke P.W., Marla S.S., Kumar A. (2019) Comparative genomic analysis of monosporidial and monoteliosporic cultures for unraveling the complexity of molecular pathogenesis of *Tilletia indica* pathogen of wheat. Sci Rep 9:8185. DOI: 10.1038/s41598-019-44464-0.

Möller M., Stukenbrock E.H. (2017) Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. Nature Reviews Microbiology 15:756-771. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.76.

Mulholland V., McEwan M. (2000) PCR-based diagnostics of *Microdochium nivale* and *Tilletia tritici* infecting winter wheat seeds. EPPO Bulletin 30:543-547. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2000.tb00944.x.

Nguyen H.D.T., Sultana T., Kesanakurti P., Hambleton S. (2019) Genome sequencing and comparison of five *Tilletia* species to identify candidate genes for the detection of regulated species infecting wheat. IMA Fungus 10. DOI: 10.1186/s43008-019-0011-9.

Nutz S., Doll K., Karlovsky P. (2011) Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Anal Bioanal Chem 401:717-26. DOI: 10.1007/s00216-011-5089-x.

Oggenfuss U., Badet T., Wicker T., Hartmann F.E., Singh N.K., Abraham L.N., Karisto P., Vonlanthen T., Mundt C.C., McDonald B.A., Croll D. (2020) A population-level invasion by transposable elements in a funcal pathogen. DOI: 10.1101/2020.02.11.944652.

Pieczul K., Perek A., Kubiak K. (2018) Detection of *Tilletia caries*, *Tilletia laevis* and *Tilletia controversa* wheat grain contamination using loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP). J Microbiol Methods 154:141-146. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.10.018.

Purdy L.H., Kendrick E.L., Hoffmann J.A., Holton C.S. (1963) Dwarf Bunt of Wheat. Annual Review of Microbiology 17:199-222. DOI: 10.1146/annurev.mi.17.100163.001215.

Ruzgas V., Liatukas Ž. (2008) Resistance genes and sources for the control of wheat common bunt (*Tilletia tritici* (DC.) Tul.). Biologija 54:274-278. DOI: 10.2478/v10054-008-0056-y.

Schumann, S., Büttner, P., Hertel, B., Preiß, U., Krämer, S., & Maier, W. (2016). *Nachweis von Tilletia spp. an Getreidesaatgut mittels Filtrationsmethode - Eine neue optimierte Untersuchungsmethode* (pp. 1–3). Beschlussfassung der Fachgruppe Saatgut im VDLUFA.

Singh J., Aggarwal R., Gurjar M.S., Sharma S., Jain S., Saharan M.S. (2020) Identification and expression analysis of pathogenicity-related genes in *Tilletia indica* inciting Karnal bunt of wheat. Australasian Plant Pathology. DOI: 10.1007/s13313-020-00711-x.

Svec D., Tichopad A., Novosadova V., Pfaffl M.W., Kubista M. (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. Biomolecular Detection and Quantification 3:9-16. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005.

Tan M.K., Raman H., Chambers G., Sharma I., Chen Z., Deshpande N., Wilkins M.R. (2016) Characterization of SNP and Structural Variations in the Mitochondrial Genomes of *Tilletia indica* and Its Closely Related Species Formed Basis for a Simple Diagnostic Assay. PLoS One 11:e0166086. DOI: 10.1371/journal.pone.0166086.

Thiessen L.D., Neill T.M., Mahaffee W.F. (2018) Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of Erysiphe necator. PeerJ 6:e4639. DOI: 10.7717/peerj.4639.

Thomsen M.C.F., Hasman H., Westh H., Kaya H., Lund O. (2017) RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. Bioinformatics 33:3917-3921. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx526.

Trione E.J. (1964) Isolation and in Vitro culture of the wheat bunt fungi *Tilletia caries* and *Tilletia controversa*. Phytopathology 54:592_596.

Vánky K. (2012) Smut fungi of the world American Phytopathological Society, Minnesota, USA.

Wang A., Pang L., Wang N., Ai P., Yin D., Li S., Deng Q., Zhu J., Liang Y., Zhu J., Li P., Zheng A. (2018) The pathogenic mechanisms of *Tilletia horrida* as revealed by comparative and functional genomics. Sci Rep 8:15413. DOI: 10.1038/s41598-018-33752-w.

Zerbino D.R., Birney E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res 18:821-9. DOI: 10.1101/gr.074492.107.

Zgraja G., Krämer S., Jonitz A., Wagner W. (2016) Identification and Quantification of Tilletia caries and T. controversa in Seed Samples and Discrimination of the Two Species. Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences 5:7.

Zouhar M., Mazáková J., Prokinová E., Váňová M., Ryšánek P. (2010) Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. Plant Protection Science 46:107-115.

10 Übersicht aller im Berichtszeitraum realisierter Veröffentlichungen

Forster MK = Grundler MK

2019

Sedaghatjoo S, Forster MK, Niessen L, Karlovsky P, Killermann B, Maier W (2019). Test performance study of a newly developed LAMP assay for the detection of *T. controversa*. Kongressband 2019 Giessen, VDLUFA Schriftenreihe Band 76/2019. VDLUFA-Verlag, Darmstadt
In Druck

Forster MK, Sedaghatjoo S, Maier W, Killermann B, Niessen L (2019). Überprüfung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des quantitativen Nachweises von *Tilletia controversa* mittels qPCR. Kongressband 2019 Giessen, VDLUFA Schriftenreihe Band 76/2019. VDLUFA-Verlag, Darmstadt
In Druck

2018

Sedaghatjoo S, Grundler MK, Geissler AJ, Niessen L, Karlovsky P, Killermann B, Maier W (2018). Simple and rapid detection of *Tilletia controversa* causing dwarf bunt in wheat seeds, poster session at: 61. Deutsche Pflanzenschutztagung, 11 - 14 September 2018, Hohenheim, Germany
https://www.pflanzenschutztagung.de/dokumente/upload/6aafb_61DPST_Programm_2018-05-17_b.pdf

Grundler MK, Sedaghatjoo S, Sedlmeier M, Killermann B, Niessen L (2018). Nachweis des Zwergsteinbrands (*Tilletia controversa*) mittels qPCR. Kongressband 2018 Münster, VDLUFA Schriftenreihe Band 75/2018. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, ISBN 978-3-941273-25-2, S. 429-433
https://www.vdlufa.de/Dokumente/Veroeffentlichungen/Schriftenreihe/SR075_2018_Kongressband.pdf

Grundler MK, Sedaghatjoo S, Maier W, Killermann B., Maier W, Niessen L (2018). Classification of wheat bunt diseases (*Tilletia* spp.) and the importance of reliable reference material for the development of new detection methods. In: Proceedings of the XX International Workshop on Smuts and Bunts in Logan, Utah, USA, p 8-9
http://orgprints.org/34173/1/XX_Bunt_Proceedings.pdf

Grundler MK, Sedlmeier M, Killermann B, Niessen, L (2018). Factors influencing the sensitivity of teliospore quantification of *Tilletia caries* and *T. controversa* by quantitative real-time PCR (qPCR). In: Meeting of the Working Group Seed Science and Certification (GPZ/GPW) & Section IV Seeds (VDLUFA) „Testing Methods and Research on Seed Quality“, 10 - 12 April 2018, IPK Gatersleben, Book of Abstracts, p 18
http://www.ipk-gatersleben.de/fileadmin/content-ipk/content-ipk-institut/Downloads/2018/Book_of_Abstracts.pdf

Sedaghatjoo S, Grundler MK, Geissler AJ, Niessen L, Karlovsky P, Killermann B, Maier W (2018). Detection of *Tilletia controversa* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). In: Meeting of the Working Group Seed Science and Certification (GPZ/GPW) & Section IV Seeds (VDLUFA) „Testing Methods and Research on Seed Quality“, 10 - 12 April 2018, IPK Gatersleben, Book of Abstracts, p 19
http://www.ipk-gatersleben.de/fileadmin/content-ipk/content-ipk-institut/Downloads/2018/Book_of_Abstracts.pdf

2017

Grundler, MK, Sedaghatjoo S, Sedlmeier M, Killermann B, Maier W, Niessen L. (2017). Steinbrand (Tilletia caries) oder Zwergsteinbrand (T. controversa)? – Entwicklung einer qualitativen sowie quantitativen

Nachweismethode. Kongressband 2017 Freising, VDLUFA Schriftenreihe Band 74/2017. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, ISBN 978-3-941273-24-5, S. 663-669
https://www.vdlufa.de/Dokumente/Veroeffentlichungen/Schriftenreihe/SR074_2017_Kongressband.pdf

Grundler MK, Sedlmeier M, Killermann B und Niessen L (2017). Methodenentwicklung zum quantitativen und qualitativen Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp.) bei Weizen mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR). In: Ökologischer Landbau weiterdenken: Verantwortung übernehmen, Vertrauen stärken. Beiträge zur 14. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Freising-Weihenstephan, 7.-10. März 2017, Verlag Dr. Köster, Berlin. ISBN: 978-3-89574-925-4, S. 144-145
http://orgprints.org/31621/1/Methodenentwicklung%20zum%20quantitativen%20und%20qualitativen.pdf

2016

Grundler M, Sedlmeier M, Voit B, Killermann B, Niessen L (2016). Initial steps in the development of a quantitative and qualitative test method for detection of wheat bunt diseases (*Tilletia* spp.) by means of Real-Time PCR assays. In: Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs (Ed.), 66. Jahrestagung 2015, 23-25 November, Raumberg Gumpenstein, p.71. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
http://www.saatgut-austria.at/MEDIA/66%20Tagungsband%2023-25%20Nov%202015%20ONLINE.pdf

Sedaghatjoo S, Maier W (2016). Toward molecular differentiation of common bunt and dwarf bunt fungi. Poster session at: ninth Young Scientists Meeting; 09 - 11 November 2016, Quedlinburg, Germany.
http://ocs.julius-kuehn.de/index.php/NWF/YSM2016/paper/view/359

Grundler MK., Sedlmeier M, Killermann B, Niessen L (2016) Etablierung von Standardgeraden zur absoluten Quantifizierung beim Nachweis von Brandkrankheiten (*Tilletia* spp.) bei Weizen mittels qPCR. Kongressband 2016 Rostock, VDLUFA Schriftenreihe Band 73/2016. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, ISBN 978-3-941273-23-8, S. 593-597
https://www.vdlufa.de/Dokumente/Veroeffentlichungen/Schriftenreihe/SR073_2016_Kongressband.pdf

Grundler M, Sedlmeier M, Voit B, Killermann B and Niessen L (2016) Development of quantitative and qualitative test methods for detection of wheat bunt diseases (Tilletia spp.) by means of Real-Time PCR assays. In: ISTA Seed Symposium Abstracts. 31st ISTA Congress, Tallinn, Estonia, 15-17 June 2016. ISBN: 978-9949-462-88-9. p 19
https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1056529.pdf

Grundler M, Sedlmeier M, Voit B, Killermann B, Niessen L (2016). Optimierung quantitativer Grundlagen im Rahmen der Entwicklung einer molekularen Nachweismethode für Brandkrankheiten (Tilletia spp.) bei Weizen mittels qPCR. In: Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft Saatgut- und Sortenwesen „Erhaltungsstrategien für Saatgut im Kontext sich verändernder Umweltbedingungen“, 04. bis 05. April 2016, Universität Regensburg und IPK Gatersleben, S. 23
https://www.ipk-gatersleben.de/fileadmin/user_upload/Saatguttagung_2016_Regensburg_Programm.pdf

2015

Sedaghatjoo S, Maier W (2015). Development of a Rapid and Sensitive Method for Detection of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. 127. VDLUFA-Congress, 15-18 September 2015, Gottingen, Germany.
https://www.vdlufa.de/Dokumente/Veroeffentlichungen/Schriftenreihe/SR071_2015_Kongressband.pdf

Grundler M, Killermann B, Voit B, Niessen L (2015). Entwicklung von quantitativen und qualitativen Nachweismethoden für Brandkrankheiten (Tilletia spp.) bei Weizen mittels qPCR. Kongressband 2015 Göttingen, VDLUFA Schriftenreihe Band 71/2015. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, ISBN 978-3-941273-20-7, S. 686-689
https://www.vdlufa.de/Dokumente/Veroeffentlichungen/Schriftenreihe/SR071_2015_Kongressband.pdf

Grundler M (2015). Development of quantitative and qualitative test methods for detection of wheat and barley bunt diseases (Tilletia spp., Ustilago nuda) by means of Real-Time PCR assays. 1st HEZagrar PhD Symposium Proceedings, Hans Eisenmann-Zentrum für Agrarwissenschaften, TU München, p 57-58
https://www.hef.tum.de/fileadmin/Veranstaltungen/2015/HEZagrar_Symp_2015_Proceedings.pdf

Anhang

Tabelle A1. Liste der gesammelten *Tilletia*-Akzessionen und weiterer phytopathogener Pilze

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
1	*T. caries*	5150903	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
2	*T. caries*	18150622	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
3	*T. caries*	32150804	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
4	*T. caries*	35150921	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
5	*T. caries*	41150831	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
6	*T. caries*	43150918	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
7	*T. caries*	49150621	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
8	*T. caries*	49150722	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
9	*T. caries*	58150915	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
10	*T. caries*	61150720	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
11	*T. caries*	61151016	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
12	*T. caries*	77150804	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
13	*T. caries*	79150803	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
14	*T. caries*	89150818	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
15	*T. caries*	89150903	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
16	*T. caries*	26151001-1	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
17	*T. caries*	26151001-2	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
18	*T. caries*	26151001-4	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
19	*T. caries*	26151001-5	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
20	*T. caries*	AA7	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
21	*T. caries*	AA8	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
22	*T. caries*	AA9	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
23	*T. caries*	AA10	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
24	*T. caries*	AA11	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja - CBS 144825	Untersucht	RN	RN
25	*T. caries*	AA12	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
26	*T. caries*	AC	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Spieß	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
27	*T. caries*	AD	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Schumann	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
28	*T. caries*	AD1	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
29	*T. caries*	AD2	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
30	*T. caries*	AD3	2017	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
31	*T. caries*	AD4	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
32	*T. caries*	AD5	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
33	*T. caries*	AD10	2017	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
34	*T. caries*	AD119	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
35	*T. caries*	AD341N	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
36	*T. caries*	AD341R	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
37	*T. caries*	ADH	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	A. Borgen	*T. caries*	-	Nein	Nicht untersucht	Nicht untersucht	RN
38	*T. caries*	ADG	2017	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
39	*T. caries*	ADP	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
40	*T. caries*	ADPS	-	*Triticum aestivum*	Dänemark	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
41	*T. caries*	AE1	2008	*Triticum aestivum*	Schweiz	F. Mascher	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
42	*T. caries*	AE2	2008	*Triticum aestivum*	Schweiz	K. Sullam	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
43	*T. caries*	AE3	2006	*Triticum aestivum*	Schweiz	K. Sullam	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
44	*T. caries*	AE5	2013	*Triticum aestivum*	Schweiz	F. Mascher	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
45	*T. caries*	AE6	2008	*Triticum aestivum*	Schweiz	F. Mascher	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
46	*T. caries*	AER	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN*	RN
47	*T. caries*	AES	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN*	RN
48	*T. caries*	AEZO	2016	*Triticum spelta*	Deutschland	S. Weller	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
49	*T. caries*	AGW	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	B. Schwab	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
50	*T. caries*	AHW	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller, H. Eichinger	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN*	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
51	*T. caries*	AI	2015	*Triticum durum*	Italien	V. Weyermann	*T. laevis* (REM *T. caries*)	Steinbrand	Ja - CBS 145171	Untersucht	RN	RN
52	*T. caries*	AKW	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
53	*T. caries*	AL	2010	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mitterer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
54	*T. caries*	AL14	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mitterer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
55	*T. caries*	AL15	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mitterer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
56	*T. caries*	AL17	2017	*Triticum aestivum*	Deutschland	M. K. Forster	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
57	*T. caries*	ALA	2018	*Triticum aestivum*	Lettland	V. Strazdina	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
58	*T. caries*	ALI1	-	*Triticum aestivum*	Litauen	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
59	*T. caries*	ALI3	-	*Triticum aestivum*	Litauen	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
60	*T. caries*	ALI10	2019	*Triticum aestivum*	Litauen	Z. Liatukas	*T. caries*	-	Nein	Nicht untersucht	Nicht untersucht	RN
61	*T. caries*	AM	2016	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Weinhappel	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
62	*T. caries*	AN	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
63	*T. caries*	AN15	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
64	*T. caries*	AO	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. caries*	Steinbrand	Ja - CBS 145172	Untersucht	RN	RN
65	*T. caries*	AOA	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	B. Schwab	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
66	*T. caries*	ARW	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
67	*T. caries*	AS	1977	*Triticum aestivum*	Schweiz	H. Zogg	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
68	*T. caries*	AS11	2011	*Triticum aestivum*	Schweiz	I. Bänziger	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
69	*T. caries*	AS14	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	B. Pölitz	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
70	*T. caries*	ASR	2014	*Triticum aestivum*	Schweiz	I. Bänziger	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
71	*T. caries*	ASW13	2013	*Triticum aestivum*	Schweiz	I. Bänziger	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
72	*T. caries*	AUN	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
73	*T. caries*	AUO	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
74	*T. caries*	AW	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
75	*T. caries*	AZH1	2015	*Triticum aestivum*	Schweiz	V. Weyermann	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
76	*T. caries*	AZH2	2015	*Triticum aestivum*	Schweiz	V. Weyermann	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
77	*T. caries*	AZH3	2015	*Triticum aestivum*	Schweiz	V. Weyermann	*T. caries*	Steinbrand	Ja - CBS 145166	Untersucht	RN	RN
78	*T. caries*	AZH4	2015	*Triticum aestivum*	Schweiz	V. Weyermann	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
79	*T. caries*	AZH5	2015	*Triticum aestivum*	Schweiz	V. Weyermann	*T. caries*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
80	*T. caries*	GD 1968	1998	*Triticum aestivum*	Rumänien	C. Gebhart	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
81	*T. caries*	GD 404	1933	*Triticum aestivum*	Lettland	V. Tumss	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
82	*T. caries*	GD 4420	1923	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Zillig	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
83	*T. caries*	GD 4425	1922	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Zillig	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
84	*T. caries*	GD 4421	1923	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Zillig	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
85	*T. caries*	GD 4427	1922	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Zillig	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
86	*T. caries*	GD 4429	2007	*Triticum aestivum*	-	R. Schultz	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
87	*T. caries*	GD 680	1977	*Triticum aestivum*	Deutschland	Bösch	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
88	*T. caries*	GD 4431	1921	*Triticum aestivum*	-	M. Rotsweols	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
89	*T. caries*	T-1	1984	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
90	*T. caries*	T-2	1989	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
91	*T. caries*	T-15	1978	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
92	*T. caries*	T-19	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
93	*T. caries*	T-30	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
94	*T. caries*	T-33	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
95	*T. caries*	T-34	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
96	*T. caries*	TillCaries 1	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
97	*T. caries*	TillCaries 2	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
98	*T. caries*	TillCaries 3	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
99	*T. caries*	TillCaries 4	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Plank, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
100	*T. caries*	TillCaries 5	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
101	*T. caries*	TillCaries 6	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
102	*T. caries*	TillCaries 7	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Plank, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
103	*T. caries*	TillCaries 8	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Plank, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
104	*T. caries*	TillCaries 9	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
105	*T. caries*	TillCaries 11	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
106	*T. caries*	TillCaries 12	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	B. Weber-Eichinger, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
107	*T. caries*	TillCaries 14	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	B. Weber-Eichinger, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
108	*T. caries*	TillCaries 15	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	B. Weber-Eichinger, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
109	*T. caries*	TillCaries 16	2019	*Triticum aestivum*	Österreich	B. Weber-Eichinger, M. Oberforster	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
110	*T. caries*	V92	2003	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
111	*T. caries*	V94	2004	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
112	*T. caries*	V117	2005	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
113	*T. caries*	V154	2012	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
114	*T. caries*	V155	2007	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
115	*T. caries / T. laevis mixture*	RU11	-	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. caries*	Steinbrand	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RN
116	*T. cerebrina*	-	1984	*Deschampsia caespitosa*	Finnland	A. & W. Fuß	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
117	*T. controversa*	OAE4	2017	*Triticum aestivum*	Schweiz	K. Sullam	*T. controversa*	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	RP
118	*T. controversa*	Vánky 528	1984	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. & I. Scholz	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
119	*T. controversa*	D-3	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
120	*T. controversa*	D-4	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
121	*T. controversa*	D-7	1999	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. caries*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
122	*T. controversa*	D-12	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
123	*T. controversa*	D-13	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
124	*T. controversa*	D-17	1999	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
125	*T. controversa*	D-18	-	*Triticum aestivum*	USA	B. J. Goates, R. J. Metzger	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
126	*T. controversa*	D-19	-	*Triticum aestivum*	Türkei	B. J. Goates, R. J. Metzger	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
127	*T. controversa*	GD 1016	1980	*Triticum* sp.	Deutschland	-	-	-	Nein	Untersucht	RP	RP
128	*T. controversa*	GD 1951	1997	*Triticum aestivum*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	RP	RP
129	*T. controversa*	GD 1952	1997	*Triticum aestivum*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	RP	Nicht untersucht
130	*T. controversa*	GD 1953	1997	*Triticum spelta*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	RP	RP
131	*T. controversa*	GD 1954	1997	*Triticum spelta*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	RP	Nicht untersucht
132	*T. controversa*	GD 1955	1997	*Triticum aestivum*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	RP	RP
133	*T. controversa*	OA1	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
134	*T. controversa*	OA2	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja - CBS 145169	Untersucht	RP	RP
135	*T. controversa*	OA3	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
136	*T. controversa*	OA4	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
137	*T. controversa*	OA5	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
138	*T. controversa*	OA6	2015	*Triticum aestivum*	Österreich	A. E. Müllner	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
139	*T. controversa*	OC1	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Spieß	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
140	*T. controversa*	OC2	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Spieß	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
141	*T. controversa*	OL	2013	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mitterer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
142	*T. controversa*	OL13	2000& 2013 mix	*Triticum aestivum*	Deutschland	M. K. Forster	-	-	Nein	Untersucht	RP	Nicht untersucht
143	*T. controversa*	OL14	2014	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mitterer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja - CBS 145167	Untersucht	RP	RP
144	*T. controversa*	OL16	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	M. K. Forster	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
145	*T. controversa*	OMO	2016	*Triticum spelta*	Deutschland	R. Klügl	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
146	*T. controversa*	OR	2013	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja - CBS 144827	Untersucht	RP	RP
147	*T. controversa*	ORB	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	S. Weller	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
148	*T. controversa*	OST	2001	*Triticum aestivum*	Deutschland	W. Wenig	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
149	*T. controversa*	OUN	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
150	*T. controversa*	OUO	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
151	*T. controversa*	OV	2011	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja - CBS 145170	Untersucht	RP	RP
152	*T. controversa*	OW	2013	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja - CBS 145168	Untersucht	RP	RP

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
153	*T. controversa*	OW15	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Ja	Untersucht	RP	RP
154	*T. controversa*	OZH	1998	*Triticum aestivum*	Schweiz	I. Bänziger	*T. controversa*	Zwergteinbrand	Nein	Untersucht	RP	RP
155	*T. controversa*	HUV 12862	1971	*Agropyron cristatum*	Rumänien	G. A. Negrean	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
156	*T. controversa*	HUV 11410	1980	*Agropyron pectiniforme*	Bulgarien	V. Calakov	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
157	*T. controversa*	HUV 10340	1980	*Elymus hispidus*	Rumänien	K. Karacsonyi	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
158	*T. controversa*	HUV 13490	1981	*Elymus hispidus*	Bulgarien	S. Kozuharov, A. Petrova	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
159	*T. controversa*	HUV 2622	1982	*Elymus hispidus*	Australien	H. Melzer	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
160	*T. controversa*	HUV 12434	1986	*Elymus repens*	Ungarn	K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RP	Nicht untersucht
161	*T. controversa*	HUV 15330	1987	*Elymus hispidus*	Deutschland	K. F. Gunther, G. Hirsch	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
162	*T. controversa* [1]	-	1988	*Hordeum* sp.	Marokko	J. Nielsen	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
163	*T. controversa*	HUV 17766	1990	*Elymus hispidus*	Iran	B. Sharifnabi	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
164	*T. controversa*	-	1997	*Alopecurus myosuroides*	Deutschland	M. Piepenbring	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
165	*T. controversa*	-	1999	*Alopecurus myosuroides*	Deutschland	M. Piepenbring	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
166	*T. controversa (T. brevifaciens)*	HUV 20802	2004	*Elymus hispidus/ Thinopyrum intermedium × Elymus repens*[2]	Polen	M. Piatek, J. Cabala	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
167	*T. controversa*	Vánky 2675	1982	*Elymus hispidus*	Ungarn	M. Juhász, K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RP	Nicht untersucht
168	*T. holci*	Vánky 765	1990	*Holcus mollis*	Neuseeland	E. H. C McKenzie, K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
169	*T. indica*	II7	2007	-	Indien	P. Chhuneja	-	-	Nein	Nicht untersucht	RN	RN
170	*T. indica*	IM5	2005	-	Mexiko	G. Fuentes	-	-	Nein	Nicht untersucht	RN	RN
171	*T. indica*	IM6	2006	-	Mexiko	G. Fuentes	-	-	Nein	Nicht untersucht	RN	RN
172	*T. laevis*	5150826	2015	*Triticum aestivum*	Frankreich	G. Orgeur	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
173	*T. laevis*	GD 4402	1935	*Triticum* sp.	USA	G. L. Zundel	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
174	*T. laevis*	GD 683	1977	*Triticum aestivum*	Schweiz	H. Zogg	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht
175	*T. laevis*	L-1	1990	*Triticum aestivum*	-	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. laevis*	Nicht gekeimt	Nein	Untersucht	RN	RN
176	*T. laevis*	L-10	1990	*Triticum aestivum*	-	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
177	*T. laevis*	L-16	1984	*Triticum aestivum*	-	R. J. Metzger, J. A. Hoffmann	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
178	*T. laevis*	L-18	-	*Triticum aestivum*	-	R. J. Metzger	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
179	*T. laevis*	L-19	-	*Triticum aestivum*	-	R. J. Metzger	*T. laevis*	Steinbrand	Ja - CBS 145173	Untersucht	RN	RN
180	*T. laevis*	L-20	-	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
181	*T. laevis*	L-21	-	*Triticum aestivum*	USA	R. J. Metzger	*T. laevis*	Steinbrand	Ja	Untersucht	RN	RN
182	*T. laevis*	LCR	-	*Triticum aestivum*	Tschechien	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
183	*T. laevis*	LI-134	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
184	*T. laevis*	LI-137	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
185	*T. laevis*	LI-138	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
186	*T. laevis*	LI-139	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
187	*T. laevis*	LI-141	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
188	*T. laevis*	LI-142	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
189	*T. laevis*	LI-143	2018	*Triticum aestivum*	Iran	M. Kheirgoo	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
190	*T. laevis*	LIT18	2018	*Triticum aestivum*	Italien	L. Mognai, A. Salerno	*T. laevis*	-	Nein	Nicht untersucht	Nicht untersucht	RN
191	*T. laevis*	LIT19	2018	*Triticum aestivum*	Italien	L. Mognai, A. Salerno	*T. laevis*	-	Nein	Nicht untersucht	Nicht untersucht	RN
192	*T. laevis*	LLFL	2015	*Triticum aestivum*	Deutschland	R. Bauer	*T. laevis*	Steinbrand	Ja - CBS 144826	Untersucht	RN	RN
193	*T. laevis*	LLI2	-	*Triticum aestivum*	Litauen	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
194	*T. laevis*	LLI80	2019	*Triticum aestivum*	Litauen	Z. Liatukas	*T. laevis*	-	Nein	Nicht untersucht	Nicht untersucht	RN
195	*T. laevis*	LQ1	-	*Triticum aestivum*	Irak	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
196	*T. laevis*	LQ2	-	*Triticum aestivum*	Irak	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
197	*T. laevis*	LQ3	-	*Triticum aestivum*	Irak	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
198	*T. laevis*	LSW	-	*Triticum aestivum*	Schweden	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
199	*T. laevis*	LT-1	-	*Triticum aestivum*	Türkei	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
200	*T. laevis*	LT-2	-	*Triticum aestivum*	Türkei	A. Borgen	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
201	*T. laevis*	V61	1997	*Triticum aestivum*	Tschechien	V. Dumalasova	*T. laevis*	Steinbrand	Nein	Untersucht	RN	RN
202	*T. laevis*	Vánky 766	1988	*Triticum aestivum*	Iran	B. Pourjam	-	-	Nein	Untersucht	RN	Nicht untersucht

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
203	*T. laevis*	WSP 73142	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
204	*T. laevis*	WSP 73143	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
205	*T. laevis*	WSP 73146	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
206	*T. laevis*	WSP 73148	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
207	*T. laevis*	WSP 73149	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
208	*T. laevis*	WSP 73150	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
209	*T. laevis*	WSP 73155	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
210	*T. laevis* [3]	WSP 73156	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
211	*T. laevis*	WSP 73152	1979	*Triticum aestivum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
212	*T. laevis*	WSP 73157	1979	*Triticum carthlicum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
213	*T. laevis*	WSP 73145	1979	*Triticum durum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
214	*T. laevis*	WSP 73153	1979	*Triticum durum*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
215	*T. lolioli*	Vánky 763	1990	*Lolium subulatum*	Iran	D. Ershad, M. Abbasi, T. & K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RN	FP
216	*T. menieri*	Vánky 581	1985	*Phalaris arundinacea*	Deutschland	H. & I. Scholz	-	-	Nein	Untersucht	RN	FP
217	*T. olida*	HUV 12682	1983	*Brachypodium pinnatum*	Italien	T. & k. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
218	*T. olida*	HUV 11766	1985	*Brachypodium sylvaticum*	Deutschland	G. Hirsch	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN
219	*T. olida*	HUV 20601	1987	*Brachypodium pinnatum*	Deutschland	K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
220	*T. secalis*	GD 1707	1984	*Secale cereale*	Deutschland	G. Deml	-	-	Nein	Untersucht	FP	FP
221	*T. secalis*	LMC 255	1993	*Secale cereale*	USA	L. Carris	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	FP
222	*T. trabutii*	Vánky 764	1990	*Hordeum murinum* ssp. *glaucum*	Iran	D. Ershad, H. Golzar, T. & K. Vánky	-	-	Nein	Untersucht	FP	RN
223	*Tilletia sp.*	WSP 73154	1979	*Aegilops biuncialis*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
224	*Tilletia sp* [4]	WSP 73147	1979	*Aegilops cylindrica*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
225	*Tilletia sp.*	WSP 73151	1979	*Aegilops cylindrica*	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
226	*Tilletia sp.*	WSP 73144	1979	*Agropyron* sp.	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
227	*Tilletia sp.*	WSP 73158	1979	*Agropyron* sp.	Türkei	R. J. Metzger	-	-	Nein	Untersucht	Nicht untersucht	Nicht untersucht
228	*Alternaria alternata*	-	2017	*Hordeum vulgare*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
229	*A. alternata*	69505	1995	*Triticum aestivum*	Deutschland	W. Radtke	-	-	Nein	NR	RN	RN
230	*Alternaria sp.*	72926	2016	*Secalse cereale*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
231	*Aspergillus niger*	71709	2001	*Solanum tuberosum*	Deutschland	M. Götz	-	-	Nein	NR	RN	RN
232	*Bipolaris sorokiniana*	72924	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
233	*Boeremia exigua var. exigua*	62040	-	*Digitalis lanata*	Deutschland	-	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
234	*Botrytis cinerea*	62086	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
235	*B. cinerea*	72325	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
236	*Cladosporium fulvum*	72927	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
237	*Fusarium acumulatum*	-	-	-	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
238	*F. avenaceum*	-	-	*Pisum sativum*	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
239	*F. culmorum*	65219	-	*Triticum durum*	Deutschland	C. Kling	-	-	Nein	NR	RN	RN
240	*F. equiseti*	-	-	*Prunus dulcis*	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
241	*F. graminearum*	64967	1987	*Triticum aestivum*	Deutschland	C. Kling	-	-	Nein	NR	RN	RN
242	*F. oxysporum*	-	-	*Prunus dulcis*	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
243	*F. poae*	73010	2017	*Hordeum vulgare*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
244	*F. sambusium*	-	-	-	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
245	*F. sporotrichioides*	72922	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
246	*F. tricinctum*	-	-	*Pisum sativum*	-	A. Sisic	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
247	*Magnaporthe oryzae*	IPP0685	2008	*Triticum aestivum*	Bolivien	M. Kohli	-	-	Nein	NR	RN	RN
248	*Monographella nivali*	72923	2016	*Triticum aestivum*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
249	*Penicillium expansum*	67687	1993	-	Deutschland	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
250	*Penicillium sp.*	-	2016	*Glycine max*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
251	*Puccinia graminis f. sp. tritici*	-	-	*Triticum aestivum*	-	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
252	*P. recondita*	77wxr	-	*Triticum aestivum*	-	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
253	*P. striiformis var. striiformis*	-	-	*Triticum aestivum*	-	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
254	*Pyrenophora tritici-repentis*	Asc-1	-	*Triticum aestivum*	Kanada	L. Lamari	-	-	Nein	NR	RN	RN

Lfd.-Nr.	Taxon	Akzessions-ID	Sammel-jahr	Wirt	Geographische Herkunft	Sammler/Vertreiber	Bestimmung der Art(-gruppe) mittels		Kultur verfügbar	Mikrosatelliten-Marker	Testergebnis Nachweis *T. controversa* mittels	
							Morphologie	Keimungstest			LAMP	qPCR
255	*P. tritici-repentis*	Asc203	-	*Triticum aestivum*	-	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
256	*Rhizoctonia cerealis*	64616	1985	*Triticum aestivum*	Deutschland	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
257	*Sclerotinia sclerotiorum*	73011	2016	*Glycine max*	Deutschland	P. Büttner	-	-	Nein	NR	RN	RN
258	*Septoria tritici*	68366	-	*Triticum aestivum*	Deutschland	H. Mielke	-	-	Nein	NR	RN	RN
259	*Sporisorium sorghi*	-	2008	-	Ägypten	M. Moharam	-	-	Nein	NR	RN	RN
260	*Ustilago hordei*	-	2010	-	Deutschland	K. J. Müller	-	-	Nein	NR	RN	RN
261	*U. avenae*	-	2012	*Arrhenatherum elatius*	Schottland	M. McNeil	-	-	Nein	NR	RN	RN
262	*U. avenae*	-	2012	*Avena sativa*	Schottland	M. McNeil	-	-	Nein	NR	RN	Nicht untersucht
263	*U. maydis*	-	-	-	-	-	-	-	Nein	NR	RN	RN
264	*U. nuda*	42874	2017	*Hordeum vulgare*	Deutschland	M. K. Forster	-	-	Nein	NR	RN	RN
265	*U. nuda*	-	2012	*Hordeum vulgare*	Schweiz	I. Bänziger	-	-	Nein	NR	RN	RN
266	*U. tritici*	-	2009	-	Deutschland	K. J. Müller	-	-	Nein	NR	RN	RN
267	*U. tritici*	-	2012	*Triticum aestivum*	Schweiz	I. Bänziger	-	-	Nein	NR	RN	RN
268	*Urocystis occulta*	-	2012	-	Deutschland	Syngenta	-	-	Nein	NR	RN	RN

CBS, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; **HUV**, Herbarium Ustilaginales Vánky, Queensland Plant Pathology Herbarium, Queensland, Australien; **WSP**, Washington State Plant Pathology Herbarium, Pullman, WA, USA; **REM**, Rasterelektronenmikroskopie; **RN**, Richtig negativ; **RP**, Richtig positiv; **FN**, Falsch negativ; **FP**, Falsch positiv; **NR**, Nicht relevant

[1] Erneut identifiziert als *T. trabutii*

[2] Akzession mit Angabe von *E. hispidus* als Wirt erhalten. Identische Akzession aber mit anderem Wirt von Carris et al. (2008) zitiert

[3] Akzession ursprünglich von R.J. Metzger als *T. caries* identifiziert

[4] Akzession ursprünglich von R.J. Metzger als T. caries identifiziert. Dies konnte nicht eindeutig bestätigt werden.