

# Phytopathogene Pilze in der forstlichen Pflanzenzucht

## Entwicklung von Schnelltests zur Qualitätssicherung bei der Forstpflanzenproduktion und Bereitstellung von leistungsstarkem Saat- und Pflanzgut

Kristin Morgenstern, Jens-Ulrich Polster, Doris Krabel

### Problem

Das Erkennen und Identifizieren von Pflanzenpathogenen ist eine der wichtigsten Voraussetzung für die Entwicklung von Behandlungskonzepten und die Umsetzung von Pflanzenschutzmaßnahmen. Von besonderem Interesse ist dabei der frühzeitige Nachweis von Pathogenen in Samen und Jungpflanzen. Hierfür müssen schnelle und sensitive Verfahren entwickelt werden, um die Einschleppung und Ausbreitung von Pflanzenpathogenen einzudämmen.

### Ziel „SeedProtect“

Etablierung eines DNA-basierten Schnelltests zum Nachweis von *Fusarium circinatum* (Pechkrebs der Kiefer), *Sphaeropsis sapinea* (Diplodia-Triebsterben) und *Lophodermium seeditiosum* (Kiefernscütte).

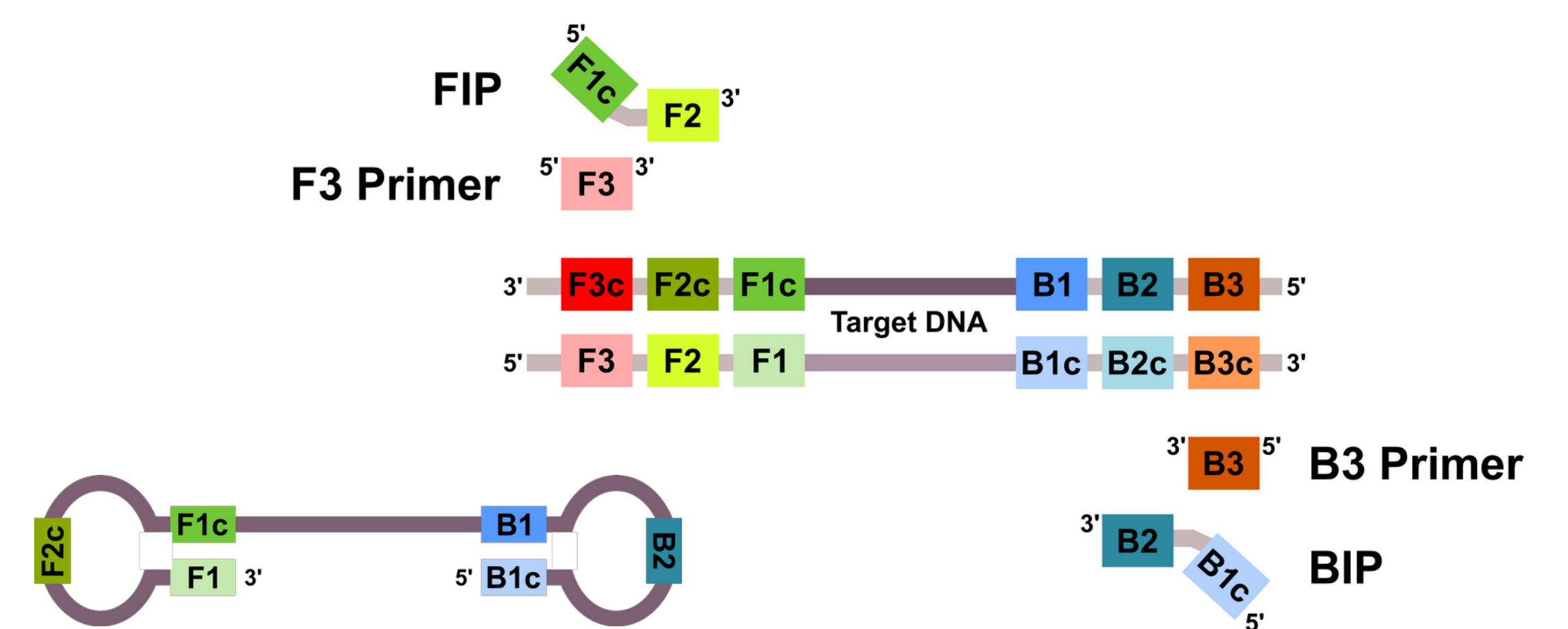
**Vorteile:**

- Amplifikation bei konstanter Temperatur im Heizblock
- Ergebnisse nach ca. 60 Minuten
- Auswertung mit bloßem Auge durch Farbumschlag möglich

### Entwicklung DNA-basierter Schnelltest

#### Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

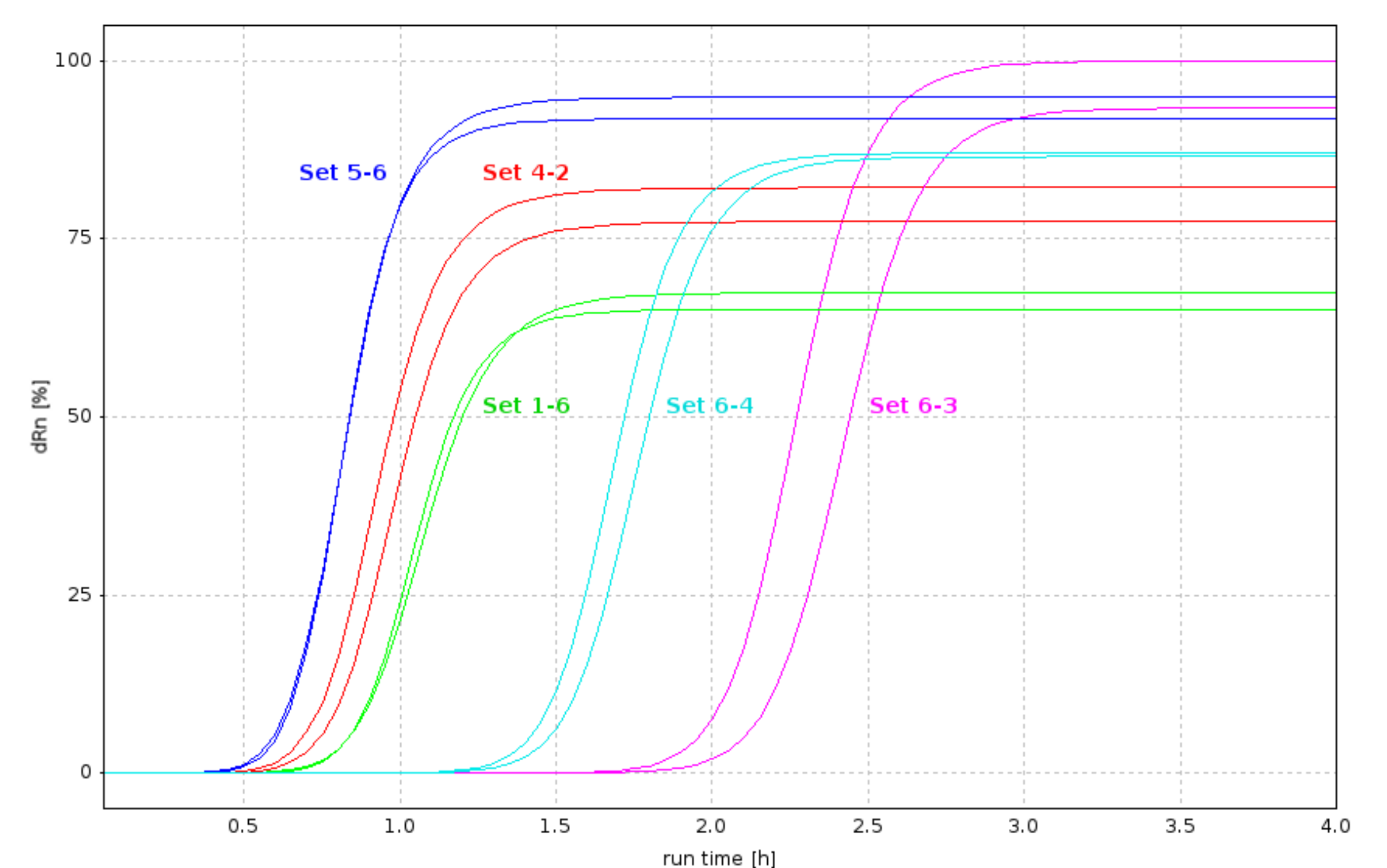
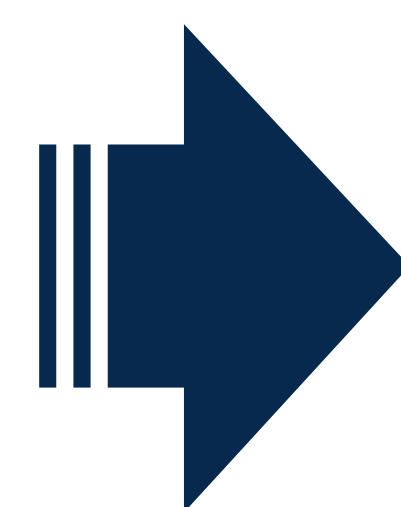
- Technik zur isothermalen Amplifikation von DNA-Abschnitten
- Polymerase mit Strangverdrängungsaktivität (Bsp. *Bst*-Polymerase)
- 4 LAMP-Primer (FIP; BIP; F3; B3), die an 6 Regionen der Target-DNA (F3c-, F2c-, F1c-Regionen auf 3'-Seite; B1-, B2-, B3-Regionen auf 5'-Seite) binden



**Abb. 1** LAMP Primer-Design: Forward Inner Primer (FIP); Backward Inner Primer (BIP); Forward Outer Primer (F3); Backward Outer Primer (B3) und LAMP-spezifische Hantelstruktur

#### Etablierung LAMP-Reaktion

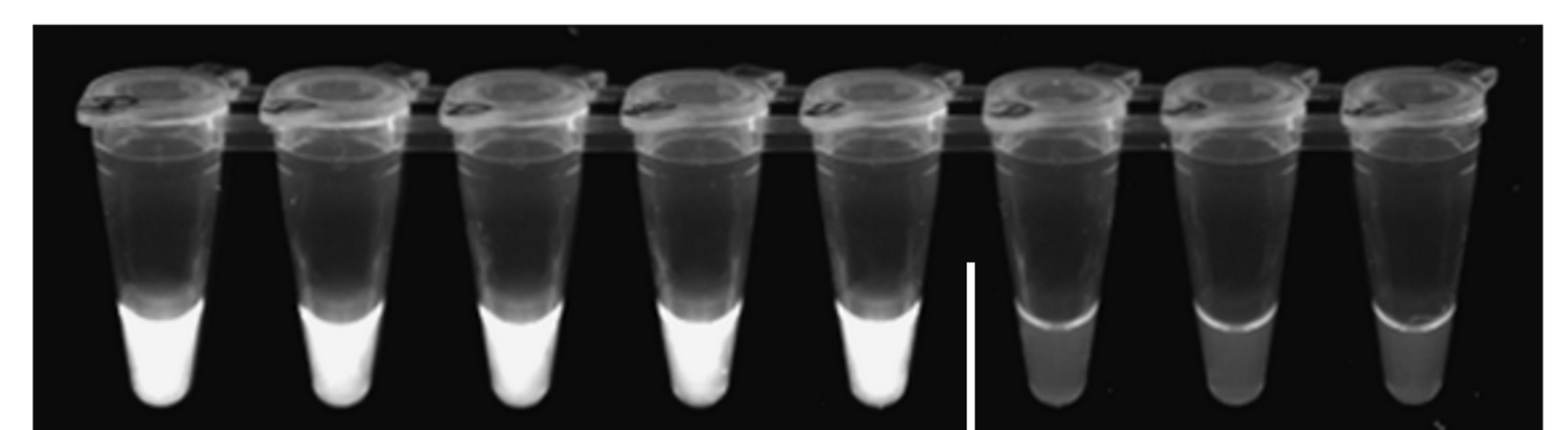
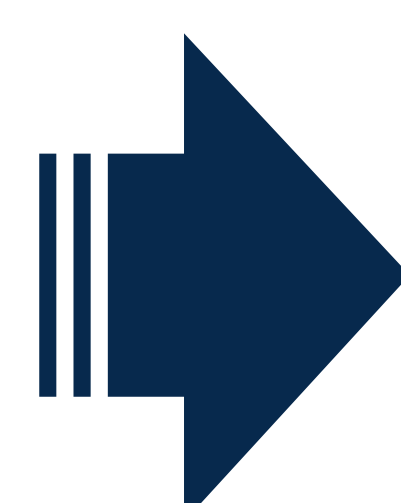
- Zusammenstellung von Sequenzinformationen für *F. circinatum*, *S. sapinea* und *L. seeditiosum* (Bsp. ENA-Nukleotidbank)
- Identifizierung potenzieller Primer-Bindungsstellen und Ableitung von LAMP-Primern (Software: PrimerExplorer V5; Eiken Chemical Co., Ltd.)
- Zusammenstellung und Test von geeigneten LAMP-Primer-Sets im Labor
- Optimierung der LAMP-Assays (Bsp. Test Polymerasen, Primer-Konzentrationen, Reaktionstemperaturen, Additive)
- Prüfung der Spezifität und Sensitivität der etablierten LAMP-Assays



**Abb. 2** Beispiel für eine LAMP-Amplifikation am Realtime-Cycler (qTower; Analytik Jena): Verschiedene LAMP-Primer-Sets im Vergleich, je Primer-Set eine Positivkontrolle in Doppelbestimmung (2 Reaktionen/Primer-Set)

#### Visualisierung von Amplifikationsprodukten

- Test Detektion mittels Metallionenindikator (Bsp. Hydroxynaphtholblau)
- Test Detektion mittels Fluoreszenzreaktion (Bsp. EvaGreen)



**Abb. 3** Beispiel für die Visualisierung von LAMP-Amplifikationsprodukte mittels Fluoreszenzfarbstoffen (GelRed, Biotium, Inc.)

#### Kontakt

Technische Universität Dresden  
Institut für Forstbotanik und Forstzoologie  
AG Molekulare Gehölzphysiologie  
Pienner Straße 7  
01737 Tharandt  
kristin.morgenstern@tu-dresden.de