

Ramona Buchheit¹, Kamilla Zegermacher², Gabriele Zgraja², Jan Hinrichs-Berger², Markus Scholler¹

Eine einfache und schnelle lichtmikroskopische Methode zur Identifizierung von Rostpilzen (*Puccinia* spp.) auf Weizen (*Triticum aestivum*) anhand von Keimporenmerkmalen der Urediniosporen

A simple and fast light-microscopical method to identify rust species (*Puccinia* spp.) on wheat (*Triticum aestivum*) using germ pore features of urediniospores

33

Zusammenfassung

In Mitteleuropa sind auf Weizen (*Triticum aestivum*) drei Rostpilzarten (Pucciniales) bekannt, nämlich der Schwarzrost (*Puccinia graminis*), der Gelbrost (*P. striiformis*) und der Braunrost (*P. triticina*). Diese Arten sind ökonomisch bedeutend. Um sie zu überwachen, frühzeitig zu erkennen und Ernteeinbußen zu minimieren, ist eine schnelle und korrekte Bestimmung der Pilzarten nötig. Hier wurde eine einfache lichtmikroskopische Methode optimiert und getestet, bei der Keimporenmerkmale der Urediniosporen zur Artdifferenzierung herangezogen werden. Die Methode lässt eine eindeutige Bestimmung zu. Die Ergebnisse werden mit Sequenzanalysemethoden in Bezug auf Bestimmungssicherheit, Zeitaufwand und Materialkosten verglichen.

Stichwörter: Pucciniales, *Puccinia graminis*, *P. triticina*, *P. striiformis*, Phasenkontrastmikroskopie, Artidentifizierung, Keimporenmerkmale, Sequenzanalyse, Methodenvergleich

Abstract

In Central Europe there are three wheat rusts (Pucciniales) all of which are economically important. These are the (black) stem rust or wheat stem rust (*Puccinia graminis*), the leaf rust (*P. triticina*) and the stripe rust

(*P. striiformis*). In order to monitor or control them effectively, efficient and reliable identification methods are needed. Here, a simple light-microscopical (phase contrast) method using germ pore features of urediniospores for identification is presented. This method makes it possible to identify the rust species exactly. In the present study this method is compared with the ITS sequence analyses with respect to identification accuracy, time and material costs.

Key words: Pucciniales, *Puccinia graminis*, *P. triticina*, *P. striiformis*, phase contrast microscopy, germ pore features, species identification, sequence analyses, method comparison

Einleitung

Rostpilze (Pucciniales) sind bedeutende Schadorganismen in der Landwirtschaft und können große Ernteeinbußen hervorrufen (z.B. LIEBENBERG und PRETORIUS, 2010, HUERTA-ESPINO et al., 2011, WELLINGS, 2011). Die wirtschaftlich bedeutendsten durch Rostpilze verursachten Krankheiten an Weizen werden durch den Schwarzrost (*P. graminis* Pers.), den Gelbrost (*P. striiformis* Westend.) und den Braunrost (*P. triticina* Erikss.) hervorgerufen (FIGUEROA et al., 2018). Diese drei Arten sind auch aus Mitteleuropa bekannt (GÄUMANN, 1959, KLENKE und SCHOLLER, 2015). Am Landwirtschaftlichen Technologie-

Affiliationen

Staatliches Museum für Naturkunde Karlsruhe, Erbprinzenstraße 13, 76133 Karlsruhe¹
Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, Neßlerstraße 25, 76227 Karlsruhe²

Kontaktanschrift

M.Sc. Ramona Buchheit, Staatliches Museum für Naturkunde Karlsruhe, Erbprinzenstraße 13, 76133 Karlsruhe, E-Mail: ramona.buchheit@smnk.de

Zur Veröffentlichung angenommen

16. Januar 2020

zentrum Augustenberg (LTZ) werden besonders häufig Proben des Braun- und des Gelbrosts aus Baden-Württemberg zur Bestimmung eingereicht. Seit einem epidemischen Auftreten 2013 in Deutschland (OLIVERA-FIRPO et al., 2017) steht zudem der Schwarzrost unter besonderer Beobachtung. Als extrem virulent gilt die Rasse Ug99, die sich seit 1998 von Uganda Richtung Norden und damit Richtung Europa ausbreitet (SINGH et al., 2015, RUSTTRACKER.ORG, 2019). Auf dem Weizen, dem Teliengewirt (Hauptwirt), werden drei Sporenstadien gebildet. Dies sind zunächst die Uredinien oder Uredolager (mit Urediniosporen), die bereits im Mai gebildet werden können. Es folgen im Sommer die dunklen Teliengewirte (mit Teliosporen). Schließlich keimen im Frühjahr des darauffolgenden Jahres Basidien (mit Basidiosporen) auf den vorjährigen abgestorbenen Blättern und Stängeln, die einen Aecidienwirt infizieren können). Zur asexuellen Verbreitung der Rostpilze des Weizens dienen Urediniosporen, die in großer Menge gebildet werden. Diese können durch Wind über mehrere hundert Kilometer verbreitet werden (ROELFS, 1985; NAGARAJAN und SINGH, 1990). Um Ernteauffälle zu minimieren und rechtzeitig angemessene und gezielte Bekämpfungsmaßnahmen zu ergreifen, ist eine schnelle und zuverlässige Identifizierung der Rostpilzarten anhand ihrer Urediniosporen nötig. Eine rein makroskopische Bestimmung der Arten anhand der Befallssymptome wäre eine schnelle Methode. Diese Methode ist jedoch bei Befall der Getreidepflanzen im Frühstadium unsicher bis unzureichend, da die typische Symptomausprägung erst im zeitlich fortgeschrittenen Zustand und bei stärkerem Befall zu erkennen ist (BLUMER, 1963). So ist beispielsweise beim Gelbrost anfangs die arttypische Anordnung der Uredinien in Reihen noch nicht erkennbar. Beim Schwarzrost tritt der typische Befall des Stängels ebenfalls erst im fortgeschrittenen Infektionsprozess auf (GÄUMANN, 1959). Ganz allgemein werden makroskopische Merkmale von Weizenrostpilzen in Bestimmungsschlüsseln – da unsicher – nicht berücksichtigt (CUMMINS, 1971, GÄUMANN, 1959, KLENKE und SCHOLLER, 2015) Auch die mikroskopisch-morphologische Bestimmung, bei der häufig von in Wasser präparierten Sporen biometrische Daten (Sporenlänge und -breite, Form, Wanddicke) zur Unterscheidung herangezogen werden, ist zeitaufwändig und nur mit reifen, d.h. morphologisch voll ausgebildeten Urediniosporen möglich. Eine heute gängige Bestimmungsmethode ist die Sequenzanalyse. Bei Rostpilzen auf Gräsern wird die ITS Region (Internal Transcribed Spacer) eingesetzt und ermöglicht eine sichere Artbestimmung (ABBASI et al., 2005, KUZDRALIŃSKI et al., 2017, LIU und HAMBLETON, 2010, BARNES und SZABO, 2007, FRAALJE et al., 2001). Dieses Verfahren, das auch am LTZ eingesetzt wird, ist jedoch relativ zeit- und kostenintensiv.

Anzahl und Verteilung der Keimporen der Urediniosporen bei Rostpilzen auf Gräsern sind bereits von CUMMINS (1956) als wichtiges Bestimmungs- und Artmerkmal bei Grasrosten erkannt worden. In diesem Beitrag testen wir mit dem Ziel der schnellen Artbestimmung Keimporenmerkmale mit Hilfe eines einfachen

lichtmikroskopischen Phasenkontrastverfahrens, das bereits bei anderen Rostpilzgruppen (SCHOLLER et al., 2014, BUBNER et al., 2019) erfolgreich eingesetzt wurde. Diese Methodik wurde am Beispiel der Rostpilze des Weizens in Bezug auf Bestimmungssicherheit, Zeitaufwand und Materialkosten untersucht und mit den Ergebnissen von ITS-Sequenzanalysen verglichen.

Material und Methoden

Belegmaterial

Belegmaterial von *P. triticina* und *P. striiformis* wurde dem LTZ von Weizenbeständen aus Baden-Württemberg im Frühsommer 2018 zur Bestimmung zugesandt. Die untersuchten Belege wurden als Referenz-Material im Herbarium des Staatlichen Museums für Naturkunde Karlsruhe (KR) hinterlegt und mit einer Referenznummer versehen (Tab. 1). Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen von *P. graminis* wurden ältere Belege aus öffentlichen Herbarien in Berlin (B) und Karlsruhe (KR) ausgewertet, teils auch von anderen Wirten, da nicht ausreichend geeignetes Material auf *Triticum aestivum* zur Verfügung stand (Tab. 1).

Mikroskopische Untersuchungen

Die Keimporenmerkmale (Anzahl, Position) wurden mit geringen Abweichungen hinsichtlich der Trocknungszeit nach der Methode von SCHOLLER et al. (2014) und BUBNER et al. (2019) ausgewertet. Sporen aus einem Sorus eines Belegs (Tab. 1) wurden auf einen Objektträger in Hoyers Medium (CUNNINGHAM, 1972) überführt und bei 400-facher Vergrößerung und Phasenkontrast untersucht (Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Je Beleg wurden 25 Sporen ausgewertet. Gegebenenfalls wurden Sporen von zusätzlichen Sori pro Objektträgerpräparat verwendet, um die Sporendichte zu erhöhen und somit die Auswertungszeit zu minimieren. Die Auswertung erfolgte sofort (unmittelbar nach Herstellung des Objektträgerpräparats) und nach 6, 14, 20, 24, 42, 48 und 66 h im Trockner (bei jeweils 40°C). Fotos der Urediniosporen wurden mittels einer Jenoptik ProgRes CT3 Digitalkamera für Mikroskope und dem Programm PROGRES CAPTUREPRO Version 2.10.0.1 (Jenoptik, Jena, Deutschland) aufgenommen.

DNA-Isolation, PCR und DNA-Sequenz-Analysen

Proben aus Baden-Württemberg, bei denen nur ein Sporenstadium (Uredinien) vorlag, wurden zur Absicherung sequenziert. Dafür wurden je Blattprobe zwischen einem und drei Uredinien mit möglichst wenig anhängendem Pflanzenmaterial mittels Skalpell und Pinzette entnommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde nach Herstelleranleitung mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Im Anschluss wurde die komplette ITS-Region der Rostpilze mit den rostpilzspezifischen Primern ITS1rustF10d (5'-TGAACCTGCAGAAGGATCATTA-3', BARNES und SZABO, 2007) bzw. Rust2inv (5'-GATGAAGAACACAGT-

Tab. 1. Belegmaterial, Funddaten, Referenznummern

Pilzart	Wirtsart (Sorte)	Herkunft	Sammel-datum	Herbarnummer	GenBank-Nr.
<i>P. graminis</i> Pers.	<i>Secale cereale</i> L.	DE, Mecklenburg-Vorpommern, Lancken-Granitz	15.08.1991	KR-M-0003108	/
<i>P. graminis</i> Pers.	<i>Elymus repens</i> (L.) Gould	DE, Nordrhein-Westfalen, Rheinbach, Hilberath	14.10.1961	KR-M-0027529	/
<i>P. graminis</i> Pers.	<i>E. repens</i> (L.) Gould	DE, Nordrhein-Westfalen, Rheinbach, Hilberath	14.10.1961	KR-M-0027525	/
<i>P. graminis</i> Pers.	<i>Triticum aestivum</i> L.	FI, Varsinais-Suomi, Tuorla	21.08.1951	B 700100001	/
<i>P. graminis</i> Pers.	<i>Lolium perenne</i> L.	DE, Baden-Württemberg, Eberbach, S Beerfelden	11.08.2005	KR-M-0018541	/
<i>P. striiformis</i> Westend.	<i>T. spelta</i> L.	DE, Baden-Württemberg, Ladenburg	08.05.2018	KR-M-0006114	MK880613
<i>P. striiformis</i> Westend.	<i>T. aestivum</i> L. (Zenon)	DE, Baden-Württemberg, Grötzingen	18.05.2018	KR-M-0006111	MK880607
<i>P. striiformis</i> Westend.	<i>T. dicoccon</i> (Schrank) Schübl. (Ramses)	DE, Baden-Württemberg, Grötzingen	18.05.2018	KR-M-0006395	MK880623
<i>P. striiformis</i> Westend.	<i>T. aestivum</i> L.	DE, Baden-Württemberg, Rotfelden	17.05.2018	KR-M-0006392	MK880614
<i>P. striiformis</i> Westend.	<i>T. aestivum</i> L. (Akteur)	DE, Baden-Württemberg, Döggingen	27.06.2018	KR-M-0006404	MK880609
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L.	DE, Baden-Württemberg, Stifterhof	29.05.2018	KR-M-0006391	MK880610
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L.	DE, Baden-Württemberg, Stetten am Heuchelberg	06.06.2018	KR-M-0006389	MK880612
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L. (Meister)	DE, Baden-Württemberg, Bönnigheim	08.06.2018	KR-M-0006388	MK880617
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L. (Bernstein)	DE, Baden-Württemberg, Tailfingen	08.06.2018	KR-M-0006401	MK880621
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L. (Faustus)	DE, Baden-Württemberg, Orschweier	08.06.2018	KR-M-0006399	MK880615
<i>P. triticina</i> Erikss.	<i>T. aestivum</i> L. (Faustus)	DE, Baden-Württemberg, Orschweier	12.06.2018	KR-M-0006397	MK880608

GAAA-´3, AIME, 2006) und ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-´3, WHITE et al., 1990) amplifiziert (LIU und HAMBLETON, 2010). Die PCR wurde mit der HotStarTaq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) wie folgt durchgeführt: Denaturierung 15 min bei 95°C, Amplifikation mit 40 Zyklen (15 sec 94°C, 30 sec 52°C für ITS-gesamt bzw. 30 sec 50°C für ITS2, 40 sec 72°C) und letzte Extension 10 min 72°C.

Für die Sequenzierung wurden die rostpilzspezifischen PCR-Amplifikate (Rust2inv/ITS4) mit dem Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) gereinigt. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit angesetzt, anschließend mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) gereinigt und auf dem Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden mit der Lasergene-Software (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) ausgewertet. Vorwärts- und Rückwärtstrang wurden zu einem Contig zusammengefügt und kontrollgelesen. Anschließend wurden die

erzeugten Sequenzdaten mit den Sequenzen der NCBI Genbank (National Center for Biotechnology Information) mittels BLAST-Funktion (Basic Local Alignment Search Tool) verglichen und identifiziert. Zur Kontrolle erfolgte ein zusätzlicher Vergleich der Sequenzen im BOLD-System (RATNASINGHAM und HEBERT, 2007).

Die hier generierten Sequenzen wurden in der NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegt.

Ergebnisse

Anzahl und Position der Keimporen

Keimporenanzahl und -position waren in der Regel direkt nach der Präparatherstellung schlecht bis gar nicht erkennbar. Nach 6 h Trocknung war eine deutliche Verbesserung der Keimporensichtbarkeit zu sehen. Die Keimporen bei *P. graminis* und *P. triticina* waren nach dieser Zeit gut zu erkennen und somit die Arten sicher bestimmbar. Nach 24 h konnte noch eine zusätzliche Ver-

besserung der Keimporenschärfe festgestellt werden. Bei *P. striiformis* waren die Keimporen ohne Trocknung nicht erkennbar. Nach mindestens 20 h Trocknung waren die Keimporen sicher erkennbar, jedoch im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Arten nicht ganz so deutlich (Abb. 1 A, B). Nach 24 h konnte eine zusätzliche Verbesserung der Keimporensichtbarkeit festgestellt werden und es wurde gleichzeitig das Optimum erreicht. Bei *P. striiformis* kann die Sichtbarmachung zusätzlich durch Zerbrechen der Sporen und Herausdrücken des Plasmas (z.B. durch vorsichtiges Drücken auf das Deckplättchen mit einem Radiergummi) verbessert werden (Abb. 1 C).

Die für die drei Arten ermittelten Keimporenmerkmale stimmen weitgehend mit denen von CUMMINS (1971) überein. Die Urediniosporen waren somit klar jeweils einer Art zuzuordnen. Die Keimporen von *P. triticina* und *P. striiformis* sind zerstreut, die von *P. graminis* äquatorial angeordnet (Abb. 1 F, G). In den folgenden Angaben zur Keimporenzahl sind unsere Werte außerhalb des 80%-Perzentsils in Klammern gesetzt, die Werte in Klammern bei CUMMINS (1971) entsprechen dagegen keinen statistisch definierten Werten. Die Keimporenzahl beträgt bei *P. striiformis* (7) 9–12 (14) (Median 10), bei

P. triticina (6) 7–9 (10) (Median 8) und bei *P. graminis* (3) 4–5 (6) (Median 4) (Abb. 2).

Mikroskopischer Bestimmungsschlüssel für mitteleuropäische Puccinia-Arten auf Weizen anhand der Keimporenmerkmale der Urediniosporen

- 1 Keimporen äquatorial,
 Ø Keimporenzahl < 6 *P. graminis*
- 1* Keimporen zerstreut,
 Ø Keimporenzahl > 6 2
- 2 Keimporenzahl meist 7–9 *P. triticina*
- 2* Keimporenzahl meist 9–12 *P. striiformis*

Kontrolle durch Sequenzierung

Die GenBank-Eingangsnummern sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Analyse der rostpilzspezifischen ITS-Sequenzen durch BLAST-Vergleich mit bereits in GenBank und BOLD hinterlegten Sequenzen bestätigt die Artzuordnung der morphologischen Bestimmung. Bei zwei Belegen, die mit allgemeinen ITS-Primern sequenziert wurden, ergab die Sequenzanalyse statt der Rostpilz-DNA die DNA eines anderen Pilzes (Kontamination). Diese

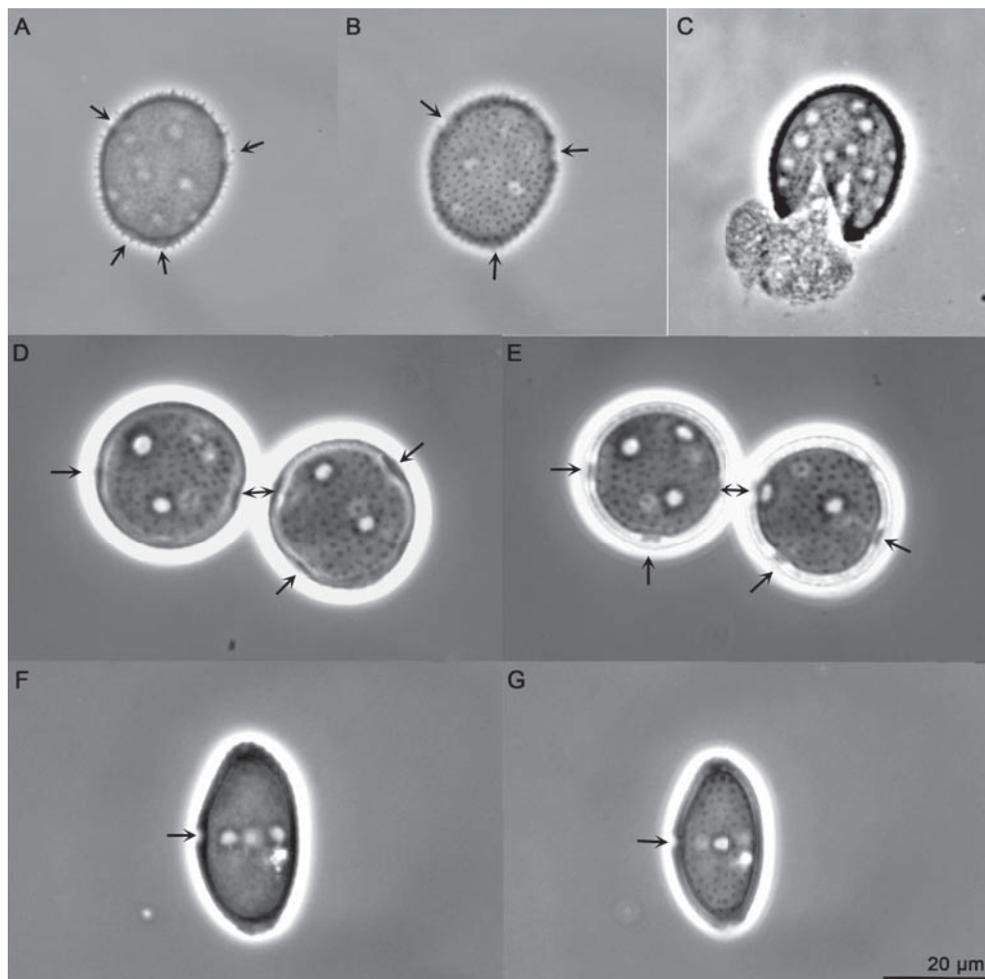


Abb. 1. Keimporen der Urediniosporen. A, B: *Puccinia striiformis*, in zwei Schärfeebenen. C: *P. striiformis*, Spore plasmafrei. D, E: *P. triticina* in zwei Schärfeebenen. F, G: *P. graminis* in zwei Schärfeebenen. Die Keimporen sind in der Aufsicht als weiße Kreise erkennbar und in der Seitenansicht durch Pfeile gekennzeichnet.

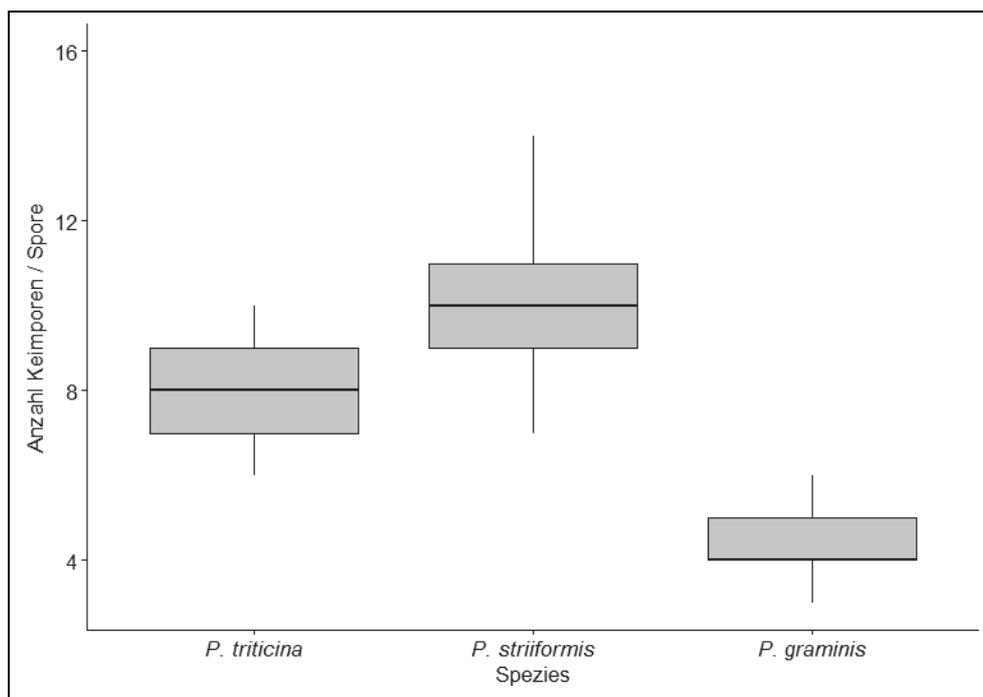


Abb. 2. Boxplot der Keimporanzahl pro Spore von *Puccinia triticultura* (n = 6), *P. striiformis* (n = 5) und *P. graminis* (n = 5). Dargestellt sind Median, „Whisker“ und Quantile.

Belege wurden nicht für die Auswertung berücksichtigt.

Zeit- und Materialaufwand

Der zeitliche Aufwand pro Probe betrug für die mikroskopische Präparation mindestens 3 min, für die Trocknung des Objektträgerpräparats 6 bis 20 h (Optimum 24 h) und für die Auswertung im Durchschnitt 18 min. Somit lag der gesamte Zeitaufwand bei ca. 20 h und 21 min. Bei der Untersuchung von mehr Proben erhöht sich entsprechend die benötigte Zeit für die Auswertung und Präparatherstellung pro zusätzlicher Probe um 21 Minuten.

Bei der Sequenzierung betrug der zeitliche Aufwand pro Probe ca. 8 h, davon wurden ca. 3 h für Pipettierarbeiten, Gerätebedienung im Labor und Auswertungen benötigt, die restliche Zeit waren Wartezeiten, d.h. Laufzeiten der Geräte (Schütteln bei der DNA-Isolierung, PCR-Lauf, Sequenzierreaktion, Sequenzierlauf auf dem Sequenzer). Es wurden meistens mehrere Proben parallel bearbeitet, daher erhöhte sich nur die Zeit für die Laborarbeit und Auswertung um ca. 50%. Die Laufzeiten der Geräte blieben dieselben. Sollten die PCR-Produkte an ein externes Labor zur Sequenzierung weggeschickt werden, verlängert sich die Wartezeit auf die DNA-Sequenzen auf 1–3 Tage.

Der Materialaufwand für die lichtmikroskopische Bestimmung pro Probe beinhaltet Hoyers Medium, einen Objektträger und ein Deckblättchen und kostet 9 Cent.

Im Vergleich zur Mikroskopie ist der Materialaufwand bei der molekularbiologischen Untersuchung viel höher. Es werden mehrere Reagenzien und Einwegmaterialien wie Pipettenspitzen, Reagenzgefäße etc. benötigt. Die Gesamtkosten für eine Sequenzanalyse mit DNA-Isolie-

rung und PCR liegen bei ca. 45 €/Probe (DNA-Isolierung plus PCR liegt bei ca. 12 €/Probe). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Diskussion

Aufgrund der großen ökonomischen Relevanz der Getreideroste wurden internationale Initiativen wie die Borlaug Global Rust Initiative (www.globalrust.org) oder das Global Cereal Rust Monitoring System (GCRMS) etabliert (PARK et al., 2011). Sie sollen unter anderem das weltweite Auftreten von Weizengelb-, -braun- und -schwarzrost kontrollieren und überwachen sowie geeignete Gegenmaßnahmen entwickeln, um die Lebensmittelversorgung weltweit zu sichern. Die Resistenzzüchtung ist durch das immer wieder neue Auftreten von Rostpilzrassen eine langfristige Aufgabe. Da die Resistenz von Sorten durch neue, virulente Roststrassen zum Teil sehr schnell überwunden werden kann, ist der Anbau resistenter Sorten als alleinige Schutzmaßnahme nicht ausreichend (KOLMER, 2005). Daher sind die Überwachung der Schaderreger und ein gezielter Fungizideinsatz im Infektionsfall nötig.

Mit der weiterentwickelten Methode nach CUNNINGHAM (1972), SCHOLLER et al. (2014) und BUBNER et al. (2019) kann eine sichere Bestimmung der Rostpilzarten auf Weizen gewährleistet werden. Sie ist nach unserer Erfahrung robuster als die Sequenzierung mit allgemeinen ITS-Primern, da immer wieder kleinste Verunreinigungen zur Sequenzierung anderer Pilzarten führen können. Diese Sequenzen können dann nicht verwendet werden. Die mikroskopische Methode hingegen ermöglicht es, bei einem Mischpräparat mit mehreren Pilzarten direkt an-

Tab. 2. Vergleich zweier Methoden zur Frühbestimmung von in Deutschland vorkommenden Rostpilzen auf Weizen

	Morphologische Bestimmung (Keimporenmerkmale)	Sequenzierung (ITS)
Artbestimmung bei reifen Urediniosporen	gut	gut
Artbestimmung bei geschlossenen Sori mit unreifen Urediniosporen	schlecht	gut
Fehlbestimmungen	nein	möglich (bei Sequenzierung mit allgemeinen ITS-Primern)
Materialkosten	gering	hoch
Zeitaufwand	≤ 20,5 h (reine Bearbeitung ca. 21 min/Probe)	8 h (reine Bearbeitungszeit ca. 3 h) 1–3 Tage (Wartezeit bei externer Sequenzierung)
Geräte	Lichtmikroskop mit Phasenkontrast, Stereomikroskop, Trockenschrank	Zentrifuge, Thermocycler, Sequenziergerät, PC
Sonstiges		Sequenzdaten

hand der Sporen eine irrelevante Pilzart (z.B. Schimmelsporen) während der Auswertung zu ignorieren und speziell die Rostpilzsporen zu analysieren. Ein weiteres wichtiges, wenn nicht sogar das wichtigste Kriterium ist der zeitliche Aufwand für die Bearbeitung. Bei Verwendung einer adäquaten Sporenmenge pro Objektträgerpräparat, errechnet sich ein Zeitaufwand von ca. 20 h 21 min je Probe (Bearbeitungszeit 21 min pro Probe). Die Sequenzanalyse erfordert am LTZ etwa 8 Stunden bei einer Bearbeitungszeit von 3 h (Tab. 2). Klar im Vorteil ist die Keimporenanalyse in Bezug auf Sachmittelkosten. Während Sequenzanalysen 45 €/Probe erfordern, liegen die Sachkosten bei Lichtmikroskopie bei 9 Cent. Ungünstig für die Keimporenanalysen sind sehr frühe Befallssymptome, wenn die Epidermis die Sori noch überdeckt. In diesem Zustand sitzen die Urediniosporen noch auf Stielen und haben noch nicht ihre arttypischen morphologischen Merkmale entwickelt. Selbst bei *P. graminis* und *P. triticina* sind die Keimporen dann noch nicht erkennbar. Dies zeigt, dass die Keimporenanalyse erst dann beginnen kann, wenn bei einer Rostpilz-Probe bei einem Sorus die Epidermis aufgerissen ist. Dies spielt bei der Sequenzanalyse keine Rolle. Die in dieser Arbeit zur Keimporenanalyse verwendete Methode muss, wie auch schon in vorherigen Publikationen gezeigt (SCHOLLER et al., 2014, BUBNER et al., 2019), für jede Pilzgruppe gesondert optimiert werden. Dies ist jedoch bei den Rostpilzen des Weizens der Gattung *Puccinia* einfach.

Schlussfolgerungen

Die morphologische Methode basierend auf Keimporenmerkmalen ist der molekularen Analyse unter bestimmten Voraussetzungen überlegen. Die Bestimmung ist problemlos möglich und Fehler durch Verunreinigungen, die hin und wieder bei Sequenzanalysen auftreten, können bei der morphologischen Analyse ausgeschlossen werden. Zudem ist der Materialaufwand deutlich geringer. Lediglich bei sehr jungen Befallssymptomen (noch von

der Epidermis geschlossene Sori mit unreifen Urediniosporen) sollte sequenziert werden, da hier morphologische Differentialmerkmale für die Bestimmung nicht ausreichend sind. Somit kann die molekularbiologische Methode früher in der Krankheitsentwicklung eingesetzt werden als die morphologische Methode. Insgesamt gesehen, ergänzen sich beide Methoden jedoch sinnvoll. Insbesondere bei der Absicherung von Untersuchungsergebnissen ist der Einsatz zweier auf unterschiedlichen Prinzipien (molekularbiologisch, morphologisch) beruhenden Nachweisverfahren geboten.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. Robert LÜCKING (Herbarium B) für die Ausleihe von *Puccinia graminis*-Belegen auf *Triticum aestivum*. Unser Dank gilt auch Dr. Josef SIMMEL und Dr. Wolfgang MAIER für die Durchsicht des Manuskripts und die wertvollen Hinweise.

Interessenskonflikte

Die Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

Literatur

- ABBASI, M., S.B. GOODWIN, M. SCHOLLER, 2005: Taxonomy, phylogeny and origin of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. *Mycoscience* 46, 241–247, DOI: 10.1007/s10267-005-0244-x.
- AIME, M.C., 2006: Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47, 112–122, DOI: 10.1007/s10267-006-0281-0.
- BARNES, C.W., L.J. SZABO, 2007: Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 97 (6), 717–727, DOI: 10.1094/PHYTO-97-6-0717.
- BLUMER, S., 1963: Rost- und Brandpilze auf Kulturpflanzen. Ein Bestimmungsbuch für die in Mitteleuropa vorkommenden Arten. Jena, G. Fischer (Abb. 36, S. 142).

- BUBNER, B., R. BUCHHEIT, F. FRIEDRICH, V. KUMMER, M. SCHOLLER, 2019: Species identification of European forest pathogens of the genus *Milesina* (Pucciniales) using urediniospore morphology and molecular barcoding including *M. woodwardiana* sp. nov. *Mycology* **48**, 1-40, DOI: 10.3897/mycokeys.48.30350.
- CUMMINS, G.B., 1956: Host index and morphological characterization of the grass rusts of the world. *Plant Disease Reporter Suppl.* **237**, 1-52.
- CUMMINS, G.B., 1971: *The rust fungi of cereals, grasses and bamboos*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer.
- CUNNINGHAM, J.L., 1972: A miracle mounting fluid for permanent whole-mounts of microfungi. *Mycologia* **64**, 906-911.
- FIGUEROA, M., K.E. HAMMOND-KOSACK, P.S. SOLOMON, 2018: A review of wheat diseases-a field perspective. *Molecular Plant Pathology* **19** (6), 1523-1536, DOI: 10.1111/mpp.12618.
- FRAAIJE, B.A., D.J. LOVELL, J.M. COELHO, S. BLADWIN, D.W. HOLLOWAY, 2001: PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 905-917.
- GÄUMANN, E., 1959: *Die Rostpilze Mitteleuropas*. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz **12**. Böhler & Co, Bern.
- HUERTA-ESPINO, J., R.P. SINGH, S. GERMÁN, B.D. MCCALLUM, R.F. PARK, W.Q. CHEN, S.C. BHARDWAJ, H. GOYEAU, 2011: Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* **179**, 143-160.
- KLENKE, F., SCHOLLER, M., 2015: *Pflanzenparasitische Kleinpilze*. Berlin, Heidelberg, Springer, DOI: 10.1007/978-3-662-46162-4.
- KOLMER, J.A., 2005: Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 441-449, DOI: 10.1016/j.pbi.2005.05.001.
- KUZDRALIŃSKI, A., A. KOT, H. SZCZERBA, A. OSTROWSKA, M. NOWAK, M. MUSZYŃSKA, M. LECHOWSKI, P. MUZYKA, 2017: Novel PCR assays for the detection of biological agents responsible for wheat rust diseases: *Puccinia triticina* and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **27** (5), 299-305.
- LIEBENBERG, M.M., Z.A. PRETORIUS, 2010: Common bean rust: pathology and control. In: *Horticultural Reviews*. Janick, J.(Hrsg.). Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, S.1-99.
- LIU, M., S. HAMBLETON, 2010: Taxonomic study of stripe rust, *Puccinia striiformis* sensu lato, based on molecular and morphological evidence. *Fungal Biology* **114** (10), 881-899.
- NAGARAJAN, S., D.V. SINGH, 1990: Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 139-153.
- OLIVERA-FIRPO, P.D., M. NEWCOMB, K. FLATH, N. SOMMERFELDT-IMPE, L. SZABO, M. CARTER, D.G. LUSTER, Y. JIN, 2017: Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. *Plant Pathology* **66**, 1258-1266, DOI:10.1111/ppa.12674.
- PARK, R., T. FETCH, D. HODSON, Y. JIN, K. NAZARI, M. PRASHAR, Z. PRETORIUS, 2011: International surveillance of wheat rust pathogens: progress and challenges. *Euphytica* **179** (1), 109-117, DOI: 10.1007/s10681-011-0375-4.
- RATNASINGHAM, S., P.D.N. HEBERT, 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* **7**, 355-364, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- ROELFS, A.P., 1985: Wheat and rye stem rust. In: *The cereal rusts*. Vol. II. ROELFS, A. P., W. R. BUSHNELL (Hrsg.), Orlando, Academic Press INC.,.
- SCHOLLER, M., M. ABBASI, F. FRIEDRICH, 2014: *Tranzschelia* in the Americas revisited: two new species and notes on the *Tranzschelia thalictri* complex. *Mycologia* **106**, 448-455, DOI: 10.3852/12-260.
- SINGH, R.P., D.P. HODSON., Y. JIN, E.S. LAGUDAH, M.A. AYLIFFE, S. BHAVANI, M.N. ROUSE, Z.A. PRETORIUS, L.J. SZABO, J. HUERTA-ESPINO, B.R. BASNET, C.X. LAN, M.S. HOVMØLLER, 2015: Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology* **105**, 872-884, DOI: 10.1094/PHYTO-01-15-0030-FI.
- RUSTTRACKER.ORG, 2019: A global wheat rust monitoring system. Zugriff 2.12.2019. https://rusttracker.cimmyt.org/?page_id=22.
- WELLINGS, C.R., 2011: Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica* **179**, 129-141, DOI: 10.1007/s10681-011-0360-y.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, J. TAYLOR, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. INNIS, M. A., D. H. GELFAND, J. J. SNINSKY, T. J. WHITE (Hrsg.): San Diego, Academic Press, S. 315-322.

© Der Autor/Die Autorin 2019.

 Dies ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (CC BY 4.0) zur Verfügung gestellt wird (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>).

© The Author(s) 2019.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).