

„Entwicklung und Bewertung von praxisorientierten Maßnahmen zur Verringerung des *Mycosphaerella anethi*-Befalls von Fenchelfrüchten“ - Zusammenfassung der Ergebnisse

Kerstin Taubenrauch, Thomas Kühne

Arbeitsaufgaben im Projekt (2012 - 2016)

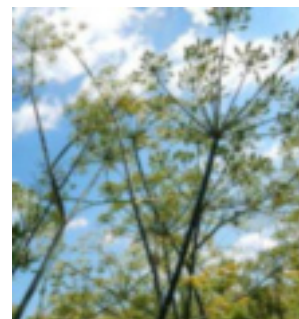
„Entwicklung und Bewertung von praxisorientierten Maßnahmen zur Verringerung des *Mycosphaerella anethi*-Befalls von Fenchelfrüchten“



1. **Entwicklung und Optimierung einer quantitativen Real-Time-PCR (qPCR)**
2. Erhaltung und Vermehrung der Gewebekulturpflanzen und Erzeugung von erregerefreiem Saatgut
3. Durchführung von Feldversuchen (praxisrelevante und epidemiologische Fragestellungen)
→ Quantifizierung des Fruchtbefalls mittels qPCR und PTA-ELISA

Ziele

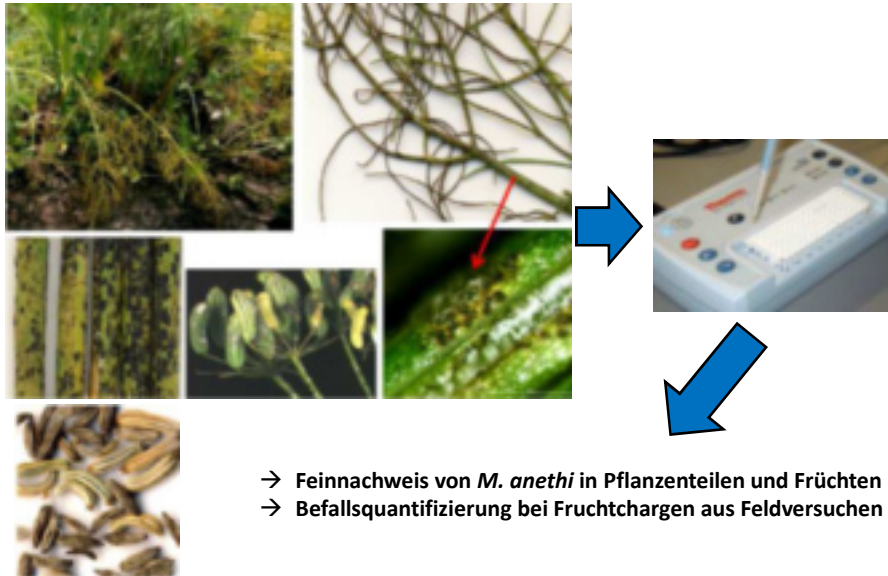
- Analyse des Pathosystems *M. anethi* - Fenchel
- Ermittlung der Einflussfaktoren für eine Epidemie



in Kooperation mit der Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller e.V. (FAH) und gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über den Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR)



„Entwicklung und Bewertung von praxisorientierten Maßnahmen zur Verringerung des *Mycosphaerella anethi*-Befalls von Fenchelfrüchten“



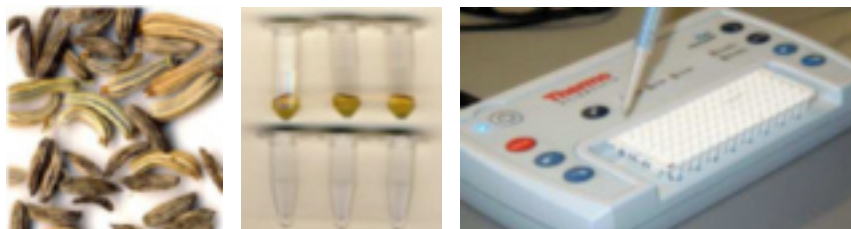
Quantifizierung des *M. anethi*-Befalls an Fenchel mittels qPCR



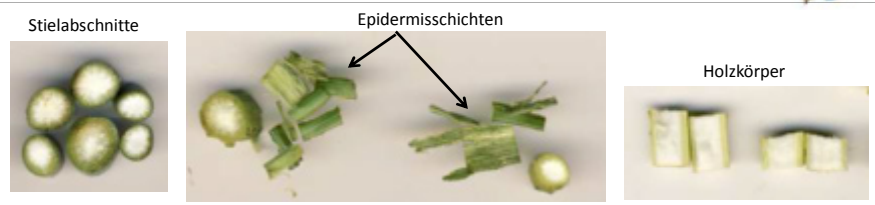
- qPCR-Test verwendet eine Sonde (Hydrolysis Probe, Farbstoff FAM)
- Nachweis ist deutlich spezifischer als mit Farbstoff SybrGreen

Testablauf

- sehr aufwändige DNA-Extraktion und -Reinigung für Nachweis notwendig
 - zahlreiche Arbeitsschritte durch Verwendung von 3 Kits (zwei DNA-Extraktionskits, ein Reinigungskit)
- qPCR zum Nachweis von *M. anethi* an Pflanzen und Fenchelfrüchten sehr gut geeignet

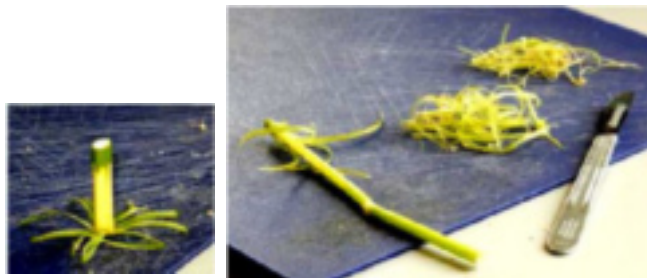


Probenaufbereitung



a) Fenchelstiele

- Abschälen der äußeren Epidermisschichten von Stielstücken = Probe
- weißer Holzkörper wird verworfen



Probenaufbereitung

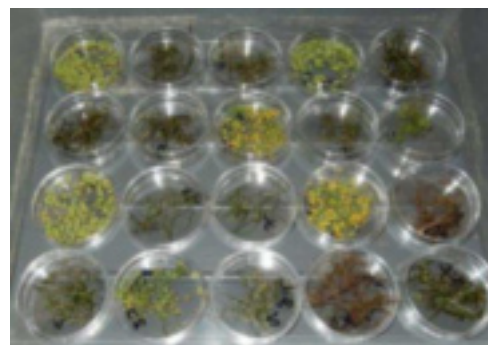


b) Fenchelblätter, Jungpflanzen, Epidermistreifen oder Stielabschnitte

- Pflanzenmaterial zerkleinern
- Trocknen in Silicagel
- Mahlen in der Kugelmühle

c) Fenchelfrüchte

- Mahlen in der Kugelmühle
- Absieben der Endospermkerne



zerkleinertes Fenchelblattmaterial in Silicagel



vor der Trocknung → nach der Trocknung

Testablauf und -einstellungen

- 0,1 g Fruchtmehl oder 0,3 g Pflanzenprobe (trocken) abwiegen
- DNA-Extraktion mit „Cell Lysis Kit + GNOME DNA Kit“ (MP-Kits)
- DNA-Reinigung mit dem „Gene Clean[®] Spin Kit“ (MP)
- Herstellung der Eichreihe aus Klon-DNA (Vereinheitlichung des Tests)
- Mitführung von 3 Standards
- DNA vorverdünnen (1:10)
- 5 µl in PCR mit Mastermix „Maxima Probe qPCR Master Mix“ (Thermo Scientific)
- PCR in der „PikoReal“ (Thermo Scientific)
- Ermittlung und Berechnung der Pilz-Konzentration in Pflanzenproben (ng *M. anethi*-DNA/ g Ausgangsprobe)



Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik

Nachweisempfindlichkeit bei Früchten

- Zugabe von befallenen Einzelfrüchten in unbefallene Saatgutprobe (8 Tubes)
- Auszählen der Früchte in unbefallener Gesamtprobe
- Ersatz einzelner Früchte durch gleiche Anzahl von befallenen Früchten

Probenzusammensetzung	unbefallene Samen	
	8 Tubes	16 Tubes
Doppelfrüchte	143	286
Einzelfrüchten	84	168
Teilfrüchte	97	194
Gesamtanzahl Früchte	467	934
Gewicht (g)	3,13	6,3



Nachweisempfindlichkeit bei Früchten

- Mahlen aller Früchte in den 8 Tubes
- Absieben der Endospermkerne
- Einwaage von je 0,1 g Fruchtmehl
- DNA-Isolierung und Quantifizierung des Pilzbefalls in der qPCR

Testtubes (8 bzw. 16 Tubes)	Anzahl Einzelfrüchte		% befallene Früchte in Probe
	unbefallene	befallene	
Probe 1	465	2	0,43
Probe 2	463	7	1,51
Probe 3	460	13	2,83
Probe 4	454	26	5,73
Probe 5	921	4	0,43



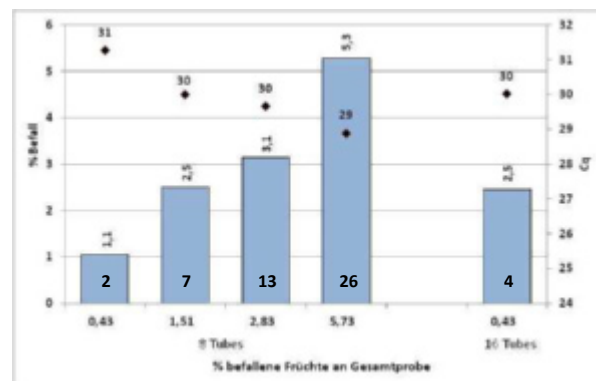
2 befallene Früchte
= 0,43 %

7 befallene Früchte
= 1,51 %

13 befallene Früchte
= 2,83 %

Nachweisempfindlichkeit bei Früchten

Befallene Früchte



- Nachweis von 0,43 % befallener Früchte in qPCR
 - bei 8 Tubes Cq = 31
 - bei 16 Tubes Cq = 30 → **positiver Nachweis**
- sicherer Nachweis von 1,5 % befallener Früchte in 8 Tubes (Cq = 29) (7 Früchte)

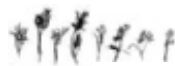
Nachweisempfindlichkeit bei Früchten



Aber: Jede Fenchelfrucht wies einen unterschiedlich starken Befall auf
→ Nachweis gelang bei geringem Befall einzelner Früchte nicht!



Nachweisempfindlichkeit bei Pflanzen



Pilznachweis negativ



Pilznachweis negativ



Pilznachweis positiv

Nachweisempfindlichkeit bei Pflanzen



- Stielproben von Feldpflanzen (Anfang Juni)
- Probenahme erfolgte 50 Tage nach der Aussaat (Stielgewicht 0,3 - 0,5 g)



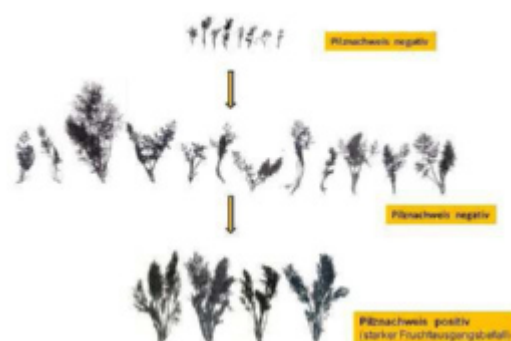
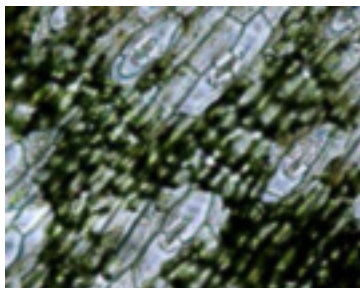
Institut für Epidemiologie und Pathodiagnostik

DNA-Isolierung und Erregernachweis in Pflanzen



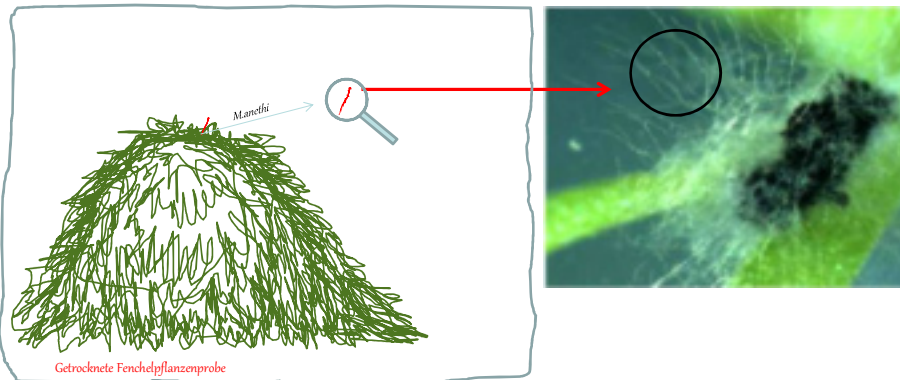
- Nachweis von *M. anethi* in Fencheljungpflanzen schwierig
 - Mycel sehr fein zwischen den Epidermisschichten verteilt
 - DNA-Gehalt bei sehr feinem Mycel äußerst gering
 - Pflanzenprobe muss relativ groß sein, um ausreichend Erreger-DNA zu isolieren
- Trocknung der Probe!

Erregernachweis bei Entwicklungsstadien von Fenchel



Institut für Epidemiologie und Pathodiagnostik

DNA-Isolierung und Erregernachweis in Pflanzen



Quantifizierung des *M. anethi*-Befalls an Fenchel mittels qPCR



Fazit

- qPCR zum Nachweis von *M. anethi* an Pflanzen und Fenchelfrüchten sehr gut geeignet
 - Test geeignet zum Nachweis des Pilzes im latenten Stadium
- sehr aufwändiger, teurer Test (Materialkosten pro Probe ca. 16 €)
→ Einarbeitung in Testung absolut notwendig
→ Anpassung an unterschiedliche Geräte wichtig



Quantifizierung des *M. anethi*-Befalls an Fenchel mittels qPCR



→ 2. Bewertung von praxisorientierten Maßnahmen - Feldversuchsauswertung

2.1 Einfluss von pflanzenbaulichen Maßnahmen auf den Fruchtbefall

- Testung von Fungiziden, Pflanzenstärkungsmitteln, Düngung und e-Beizung
- Variation des Pflanzenabstands, Einsatz von Zwischensaaten



2.2 Epidemiologische Analysen

- Bodenübertragungs- und Topfversuche
- Verbreitung von Konidien im Bestand



2.3 Anbau von Genbankherkünften

- Ermittlung potenzieller Resistenzquellen

Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik



Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!