

Entwicklung eines PCR Nachweises zur Differenzierung verschiedener Keimlingsfäuleerreger an Zuckerrüben

Einleitung und Versuchsbeschreibung

Die Späte Rübenfäule an Zuckerrüben, hervorgerufen durch den bodenbürtigen Pilz *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IIIB), stellt in vielen Anbaugebieten Europas, aber auch weltweit, eine wirtschaftlich bedeutende Krankheit dar, deren Bekämpfung bisher nur über den Anbau von resistenten Zuckerrübensorten und pflanzenbaulichen Maßnahmen, wie der Gestaltung der Fruchtfolge, möglich ist. Der Nachweis dieser Krankheit im Boden ist aufgrund des nesterweisen Auftretens sehr schwierig (Abb. 1).

Eigene Untersuchungen konnten zeigen, dass ein Fangpflanzentest im Gewächshaus mit Zuckerrübenkeimpflanzen zumindest eine Abschätzung des Inokulumpotentials erlaubt. Aufgrund des nesterweisen Auftretens der Krankheit ist jedoch für einen derartigen Test eine repräsentative Bodenprobe erforderlich. Anhand des Befalls der Zuckerrüben kann dann der Erregernachweis erfolgen und über das Ausmaß des Befalls auf das Inokulumpotential des Bodens geschlossen werden. Neben *R. solani* kommen in natürlich infiziertem Boden in hohem Maße meist ubiquitär weitere Erreger wie *Aphanomyces cochlioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma betae* und *Pythium ultimum* vor, welche als Erregerkomplex für Keimlingsfäulen an jungen Zuckerrübenpflanzen verantwortlich sind. Für die genaue Diagnose sollte daher ein PCR Nachweis für alle angesprochenen Krankheiten aus erkrankten Pflanzen entwickelt werden.



Abb. 1: Die Späte Rübenfäule an Zuckerrüben tritt in Befallsnestern auf, welche nicht vorhersagbar sind.

Ergebnisse

W P.u. R.s. Ph.b. A.c. F.o. M

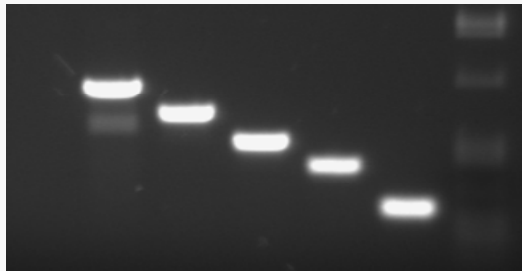


Abb. 2: Größen der spezifischen PCR-Produkte für *Pythium ultimum* (P.u.; 792 bp), *Rhizoctonia solani* (R.s.; 652 bp), *Phoma betae* (Ph.b.; 523 bp), *Aphanomyces cochlioides* (A.c.; 435 bp) und *Fusarium oxysporum* (F.o.; 291 bp). Wasserkontrolle (W) und Marker (M).

Um die einzelnen Sequenzen der Erreger zu identifizieren, wurden verschiedene Isolate von *Rhizoctonia solani* und den weiteren Krankheitserregern ausgewählt. Mit Hilfe von degenerierten Primern zur Teilamplifikation des Translationselongationsfaktors 1 α (EF-1 α) (Rehner, 2001) erfolgte dann die Amplifikation. Die gewonnenen Fragmente wurden anschließend kloniert und sequenziert. Da mit Hilfe der genannten Primer für *P. ultimum* keine Fragmente gewonnen werden konnten, wurde hier die Klonierung und Sequenzierung der „Internal transcribed spacer“ Region (ITS) durchgeführt (White et al., 1990).

Anhand der EF-1 α Sequenzen erfolgte die Entwicklung verschiedener Primer für die jeweiligen Erreger, welche sich in ihren Amplifikationsbedingungen ähneln, aber unterschiedliche Produktgrößen lieferten und mit denen der spezifische Einzelnachweis möglich war (Abb. 2). Die Primer wurden anschließend auch an verschiedenen Mischungen mit gereinigter DNA aus Reinkulturen der Erreger und aus infizierten Keimpflanzen getestet, wo sie ebenfalls eine Diagnose ermöglichten (Abb. 3 und 4).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

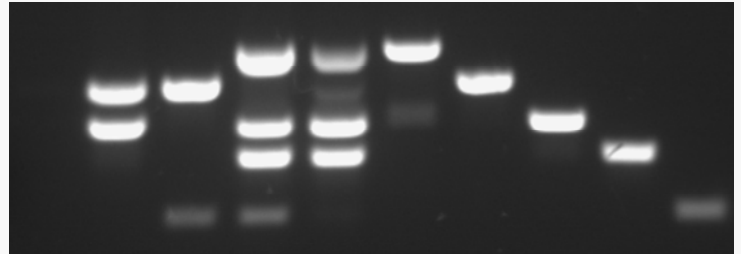


Abb. 3: Multiplexnachweis der Erreger in Mischungen von gereinigter DNA aus Reinkultur mit unterschiedlichen Primerkombinationen (1 = Wasserkontrolle; 2 = *Rhizoctonia* + *Phoma*; 3 = *Rhizoctonia* + *Fusarium*; 4 = *Pythium* + *Aphanomyces* + *Phoma* + *Fusarium*; 5 = *Pythium* + *Rhizoctonia* + *Aphanomyces* + *Phoma* + *Fusarium*; 6 – 10 = spezifischer Erregernachweis).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

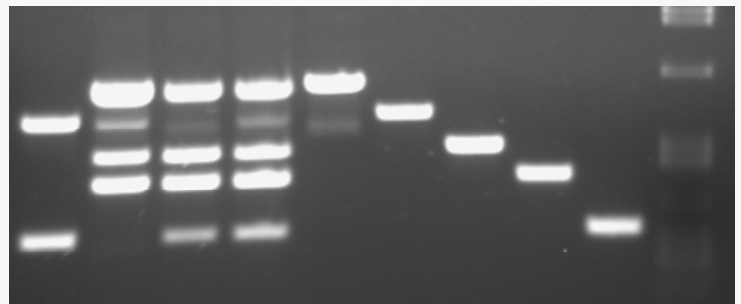


Abb. 4: Multiplexnachweis der Erreger in DNA Mischungen aus infiziertem Pflanzengewebe mit unterschiedlichen Primerkombinationen (1 = *Rhizoctonia* + *Fusarium*; 2 = *Rhizoctonia* + *Aphanomyces* + *Pythium* + *Phoma*; 3 = *Aphanomyces* + *Pythium* + *Phoma* + *Fusarium*; 4 = *Rhizoctonia* + *Aphanomyces* + *Pythium* + *Phoma* + *Fusarium*; 5 – 9 = spezifischer Erregernachweis; 10 = Marker).

Zusammenfassung

Der spezifische Erregernachweis mit Hilfe der einzelnen Primer war sehr gut reproduzierbar. Die Nachweisempfindlichkeit von pilzlicher DNA liegt für die unterschiedlichen Primer zwischen 1 und 10 pg.

Der Multiplexnachweis war nicht für sämtliche Erreger möglich. Bei Zugabe von *R. solani* Primern zur Reaktion sämtlicher weiterer Pathogene war keine *R. solani* Amplifikation möglich. Dies wurde auf eine Primerinteraktion zurückgeführt. Die vier Erreger *P. ultimum*, *P. betae*, *A. cochlioides* und *F. oxysporum* konnten in einer Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 4, Spur 3). *R. solani* musste in einer getrennten Reaktion (Abb. 4, Spur 6) detektiert werden.

Als eine weitere Möglichkeit des genauen Erregernachweises im Vergleich zur visuellen Bonitur liefert die vorgestellte Methode gute Ergebnisse. Der darüber hinaus gehende Einfluss von Antagonisten und Umwelteinflüssen, die das Auftreten der Späten Rübenfäule im Feld beeinflussen können, lässt sich jedoch auch mit dieser Methode nicht vorhersagen.

Literatur

Rehner (2001): Persönliche Mitteilung, <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/>

White et al. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds): 315-322. Academic Press, San Diego.