

## **Entwicklung einer Nachweismethode zur Bewertung von Saatgut- chargen bezüglich des prozentualen Befalls von *Mycosphaerella* *anethi* an Fenchelfrüchten und Jungpflanzen**

<b>Laufzeit</b>	01.01.2009 - 31.05.2012
<b>Forschungsstelle</b>	Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik Erwin-Baur-Straße 27 06484 Quedlinburg
<b>Projektleitung</b>	Prof. Dr. Thomas Kühne
<b>Förderung</b>	Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz unter dem Förderkennzeichen 22018208 bzw. 08NR182 aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundes- tags.

Gefördert durch:  
 Bundesministerium für  
Ernährung, Landwirtschaft  
und Verbraucherschutz  
aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



### **Problemstellung/Zielsetzung**

#### **1. Entwicklung einer hochsensitiven, praxisrelevanten Methode für den Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten**

Der pilzliche Erreger *Mycosphaerella anethi* (anamorph *Passalora punctum*) führt im Arzneifenchelanbau (*Foeniculum vulgare* Mill.) regelmäßig zu hohen Ertragsausfällen. Zielsetzung des Projekts war die Entwicklung und Standardisierung einer praxistauglichen PCR-gestützten bzw. serologischen Methode zur Detektion des *M. anethi*-Befalls an Handelsware und Saatgut. Ein einheitliches Bewertungssystem sollte die Selektion von befallsarmem bzw. -freiem Saatgut ermöglichen und zur Verbesserung der Konsumqualität von Fenchel beitragen. Die Charakterisierung der vorhandenen Hochleistungssorten bezüglich ihrer genetischen Prädisposition für Saatgutbefall kann die Sortenwahl vereinfachen und Ertragsausfälle vermeiden helfen. Zur Kontrolle der Aussagekraft der im Labor ermittelten Daten wurden Feldversuche an zwei Standorten angelegt.

#### **2. Einsatz der Gewebekultur zur Erzeugung unbefallener Fenchelpflanzen aus dem bestehenden Fenchelsortenspektrum**

*M. anethi* ist hochgradig samenübertragbar und kann bisher nicht effektiv bekämpft werden. Im Projekt wurden die Möglichkeiten zur Erzeugung von befallsfreiem Sortenbasismaterial untersucht. Mit den erregerefreien Pflanzen sollen zukünftig epidemiologische Fragen (u.a. räumliche Ausbreitung der Konidien, Bodenübertragbarkeit) erforscht werden. Darüber hinaus muss geprüft werden, ob steril vermehrte, befallsfreie Pflanzen den Grundstock für die Erzeugung von

erregerefreiem Saatgut bilden können, d.h. ein Feldbestand bis zur Abreife gesund erhalten werden kann.

### **3. Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *M. anethi***

Bisher fehlten jegliche Informationen über eine mögliche genetische Variabilität bzw. Diversität dieses Schadpilzes, der lange Zeit als nicht auf künstlichen Medien kultivierbar galt. Bedingt durch die sehr schwierige experimentelle Handhabung des Erregers sind die Kenntnisse über *M. anethi* noch äußerst begrenzt. Vergleichende systematische Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener Isolate wurden bisher nicht durchgeführt. Für eine effektive Resistenzzüchtung bei Fenchel ist die Kenntnis der Pathogenitäts- bzw. Virulenzeigenschaften des Inokulums von großer Bedeutung. Bisher wurde angenommen, dass die genetische Neukombination bei *M. anethi* in unserem Klima keine Rolle spielt. Dieser Sachverhalt muss überprüft und bewertet werden.

## **Ergebnisse**

### **1. Entwicklung einer hochsensitiven, praxisrelevanten Methode für den Nachweis von *M. anethi* an Fenchelfrüchten**

#### **1.1 Molekularbiologischer Erregernachweis (RT-PCR)**

Als Hauptproblem für die Entwicklung einer spezifischen und empfindlichen genombasierten Nachweismethode erwies sich die Isolierung der Pilz-DNA. Es wurden 17 kommerzielle Kits verglichen; die Ergebnisse waren im Wesentlichen gleich. Die DNA-Ausbeute war, unabhängig vom Ausgangsmaterial (Reinkultur, Samenmehl, infizierte Pflanze), in allen Fällen sehr gering. Aus diesem Grund wurde weiterhin der bewährte DNA-Isolierungskit der Firma Qiagen (Puregene Yeast /Bact. Kit B) eingesetzt, da er aufgrund seines Baukastensystems am besten auf die Probeneigenschaften von Frucht- und Mycelmehl einzustellen war. Die Reinheit der Präparationen (UV-Spektrum und elektrophoretische Kontrolle) war zuerst nicht optimal (Verunreinigungen durch Melanin, Proteine, und Fenchelöl). Die DNA-Qualität konnte aber durch einen Reinigungskit der Fa. MP Biochemicals (GeneClean Spin Kit) wesentlich verbessert werden, der speziell für die Isolierung von DNA aus Bodenproben angeboten wird. Da sich das zu Projektbeginn bereits vorhandene *M. anethi*-spezifische Primerpaar im Laufe der Untersuchungen als wenig geeignet erwies, mussten weitere Genomsequenzen des Erregers mit Hilfe randomisierter Dekamerprimer (OPA) generiert werden. Die DNA-Fragmente wurden amplifiziert, kloniert und sequenziert. Aus den Sequenzdaten wurden 20 Primerpaare abgeleitet und für den spezifischen und empfindlichen Nachweis von *M. anethi* getestet. Es konnten 2 Primerpaare selektiert werden, die in der PCR auch mit 1:50 verdünnten DNA-Präparationen zu spezifischen Amplifikationsprodukten führten. Mit ihnen konnten die Sensitivität des Nachweises und die Testsicherheit deutlich erhöht werden. Erste Testungen in einer Real-Time PCR waren sehr vielversprechend, das Erregermycel war in befallenen Keimlingen und in Früchten klar nachzuweisen. Die eingesetzte Gesundkontrolle (DNA aus Gewebekulturpflanzen) war eindeutig befallsfrei. Für die angestrebte Quantifizierung des Befalls von Fruchtmaterial stehen zahlreiche DNA-Proben bereit. Nach der Optimierung der Testparameter kann im Nachfolgeprojekt umgehend mit der Probenquantifizierung begonnen werden.

#### **1.2 Serologischer Erregernachweis (Semi-quantitativer PTA-ELISA)**

Zum serologischen Nachweis von Pilzmycel wurde ein semi-quantitativer PTA-ELISA entwickelt und optimiert. Unter Mitführung einer definierten Konzentrationsreihe kann der Befallsgrad von Fruchtchargen aus Produktions- und Vermehrungsbeständen reproduzierbar bestimmt werden. Es wurde eine Testempfindlichkeit erreicht, die den Pilznachweis auch in scheinbar symptomlosen Fruchtproben möglich macht. Bei der Befallsbewertung der Fruchtproben aus den Feldversuchen wurde eine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen

der Serodiagnose und der Sichtbonitur erhalten. Die Rangeinstufungen aufgrund des Pilzbefalls waren in Mehrfachtestungen der Prüfglieder sehr konstant verteilt. Mit Hilfe der entwickelten ELISA-Varianten gelang jedoch kein Erregernachweis in Jungpflanzen, die aus nachweislich pilzhaltigen Samen gezogen worden waren. Durch den Einsatz eines Amplifikationskits zur weiteren Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des PTA-ELISA konnten die Unterschiede zwischen niedrig befallenen Chargen präziser ermittelt werden. Auch hier waren die Testergebnisse signifikant korreliert. Es zeigte sich, dass der Befall des Erntegutes nicht nur durch den Befallsgrad des eingesetzten Saatgutes bestimmt wurde; der Standort und die Vegetationsbedingungen während der epidemischen Phase des Erregers waren weitaus bedeutender. Eine Bewertung der Prüfglieder unterschiedlicher Sorten im Hinblick auf ihre Anfälligkeit gegenüber *M. anethi* war mit der entwickelten serologischen Testmethode sehr gut möglich.

## **2. Einsatz der Gewebekultur zur Erzeugung unbefallener Fenchelpflanzen aus dem bestehenden Fenchelsortenspektrum**

Es wurden umfangreiche Voruntersuchungen zur Überführung von Fenchelpflanzen in Gewebekultur durchgeführt, da sich die in der Literatur genannte Vorgehensweise als nicht praktikabel erwies. Der Kontaminationsgrad der Früchte mit Fremdpilzen und Bakterien war bei geringer Desinfektion zu hoch bzw. die Keimung war bei stärkerer Desinfektion nicht mehr möglich. Die Verwendung von Keimlingspflanzen erwies sich als sehr viel einfacher, da die Pflanzen aus Erdanzucht kräftiger auswuchsen als nach einer Desinfektionsbehandlung auf künstlichem Medium. Nach einer 50 minütigen Desinfektionsbehandlung mit Sublimat (0,1%) wurden 8 Fenchelsorten in Gewebekultur genommen und das Kallusgewebe weitervermehrt. Bei 6 Sorten entwickelten sich Pflanzen, die nach ausreichender Wurzelbildung in Erdkultur überführt wurden. Nach ersten Untersuchungen in der RT-PCR war das Kallusgewebe von 10 Isolierungen erregerefrei. Die vollentwickelten Pflanzen wurden zur Saatguterzeugung im Gewächshaus und im Freiland ausgepflanzt. Im Nachfolgeprojekt soll das Erntegut in der RT-PCR getestet werden.

## **3. Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *M. anethi***

Da sich *M. anethi* auf künstlichen Medien nur extrem langsam entwickelt, war die Anlage reiner Isolate experimentell sehr anspruchsvoll und zeitaufwändig. Die Isolategewinnung von natürlich infiziertem Blattmaterial gelang nur bei ca. 4 % der desinfizierten Blattstücke. Ab Vorlage der Reinkultur dauerte die Erzeugung von 0,1 g trockenem Mycel ca. 6 Monate, wobei dieses dann ausreichend für eine einzige DNA-Extraktion war. Dennoch konnte eine Sammlung von 100 neuen Isolaten von Praxisstandorten und den eigenen Versuchspartzen angelegt werden. Mit Hilfe von ITS-Primern wurden erste molekularbiologische Unterschiede zwischen diesen Isolaten nachgewiesen. Eine erste vergleichende Analyse von 30 Isolaten mittels BOX-PCR offenbarte zahlreiche unterschiedliche Bandenmuster. Damit wurden die methodischen Voraussetzungen zur Weiterführung des genom-basierten Vergleiches der *M. anethi*-Isolate geschaffen.

## **Projektbezogene Veröffentlichungen**

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.

*Mycosphaerella anethi*-Befall an Körnerfenchel: Möglichkeiten der Schadensverringerng.  
Teil 1, Gemüse (2008); 3

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.

*Mycosphaerella anethi*-Befall an Körnerfenchel: Möglichkeiten der Schadensverringerng.  
Teil 2, Gemüse (2008); 4

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.  
Mykologische Untersuchungen von *Mycosphaerella anethi* an Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.)  
Mitt. Julius Kühn-Institut (2008); 417, 387-388

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.  
Dualkulturen von Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) und *Mycosphaerella anethi* – Symptombildung und Ausbreitung  
Mitt. Julius Kühn-Institut (2008); 417, 388

Taubenrauch, K.; Hau, B.; Kühne, T.  
*Mycosphaerella anethi* - ein samenübertragbarer Schaderreger an Fenchel  
57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06.- 09.09.2010, Berlin  
Julius Kühn-Archiv (2010), 428, 401

Taubenrauch, K.; Hau, B.; Kühne, T.  
Ermittlung des Befallsniveaus von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten  
57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06.- 09.09.2010, Berlin  
Julius Kühn-Archiv (2010), 428, 402

Taubenrauch, K.; Kühne, T.  
Entwicklung einer PCR - Methode zum Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelsaatgut  
18. Bernburger Winterseminar, 17.-18.02.2009, Bernburg, Tagungsband S. 44

Taubenrauch, K.; Hau, B.; Kühne, T.  
*Mycosphaerella anethi* – ein samenübertragbarer Schaderreger an Fenchel  
Poster auf der 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06.- 09.09 2010, Berlin

Taubenrauch, K.; Hau, B.; Kühne, T.  
Ermittlung des Befallsniveaus von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten  
Poster auf der 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06.- 09.09 2010, Berlin

Taubenrauch, K.; Kühne, T.  
Projektvorstellung: Entwicklung einer quantitativen Methode zum Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten  
Poster auf der Tagung „Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg“, 25.-26.10.2010, Neustadt an der Weinstraße

Taubenrauch, K.; Kühne, T.  
Projektvorstellung: Entwicklung einer quantitativen Methode zum Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten  
Tagung Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 25. - 26.10.2010 in Neustadt an der Weinstraße, Tagungsband S. 193

Taubenrauch, K.; Kühne, T.  
Erste Ergebnisse zur quantitativen Ermittlung des *Mycosphaerella anethi* - Befalls an Fenchelfrüchten  
Poster auf der Tagung „Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg“, 25.-26.10.2010, Neustadt an der Weinstraße

Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Erste Ergebnisse zur quantitativen Ermittlung des *Mycosphaerella anethi*-Befalls an Fenchel-  
früchten

Tagung Arzneipflanzenanbau in Deutschland – mit koordinierter Forschung zum Erfolg, 25. -  
26.10.2010 in Neustadt an der Weinstraße, Tagungsband S. 194

Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Totalverlust von Fenchelernte durch *Mycosphaerella anethi*-Befall

Poster auf dem 21. Bernburger Winterseminar, 22.-23.02.2011, Bernburg

Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Bewertung von Arzneifenchelchargen bezüglich des quantitativen Befalls von *Mycosphae-  
rella anethi*

Poster auf der 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 19.-22.09.2011, Berlin, Tagungs-  
band S.173-175

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Pank, F.; Krüger, H.; Hau, B.

Einfluss der Stärke des *Mycosphaerella anethi*-Befalls auf den Ertrag und die qualitätsbe-  
stimmenden Merkmale der Arzneifenchelsorte "Magnafena" (*Foeniculum vulgare* Mill.)

18. Bernburger Winterseminar und 5. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 18. -  
21.02.2008, Bernburg, Tagungsband S. 64-66

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Pank, F.; Krüger, H.; Hau, B.

Auswirkungen des *Mycosphaerella anethi*-Befalls auf Ertrag und qualitätsbestimmende In-  
haltsstoffe von Arzneifenchelsorten (*Foeniculum vulgare* Mill.)

18. Bernburger Winterseminar und 5. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 18. -  
21.02.2008, Bernburg, Tagungsband S. 63-64

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.

Samenübertragbarkeit von *Mycosphaerella anethi*

18. Bernburger Winterseminar und 5. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, 18. -  
21.02.2008, Bernburg, Tagungsband S. 40-41

Taubenrauch, K.; Gabler, J.; Hau, B.

*Mycosphaerella anethi* - Befall an Fenchel: Problematik, Wissensstand und neue For-  
schungsansätze

Vortrag auf der Sitzung der FAH Arbeitsgruppe „Arzneipflanzenanbau“ der Forschungsvereini-  
gung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), 11.07.2007, Quedlinburg

Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Projektskizze: „Entwicklung einer Nachweismethode zur Bewertung von Saatgutchargen be-  
züglich des prozentualen Befalls von *Mycosphaerella anethi* an Fenchel Früchten und Jung-  
pflanzen“

Vortrag auf der Sitzung der FAH Arbeitsgruppe „Arzneipflanzenanbau“ der Forschungsvereini-  
gung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), 02.07.2008, Vestenbergsgreuth

Taubenrauch, K.; Kühne, T.

Entwicklung einer Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Mycosphaerella  
anethi* an Fenchel Früchten und Jungpflanzen

Vortrag auf dem JKI Kolloquium, 02.07.2009, Quedlinburg

Taubenrauch, K., Kühne, T.

Arbeitsfortschritte: Entwicklung einer Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten und -jungpflanzen

Vortrag auf dem JKI Wissenschaftlerseminar, 22.09.2009, Quedlinburg

Taubenrauch, K., Kühne, T.

Ermittlung der Direktwirkung von Fungiziden auf *Mycosphaerella anethi* im Agarplattenversuch

Vortrag auf dem Anwenderseminar zum Pflanzenschutz in Arznei- und Gewürzpflanzen, 03.02.2010