

**Schlussbericht
zum Vorhaben**

Thema:

**Entwicklung einer Nachweismethode zur Bewertung von
Saatgutchargen bezüglich des prozentualen Befalls von
Fenchel Früchten und Jungpflanzen mit *Mycosphaerella anethi***

Zuweisungsempfänger und ausführende Stelle:

**Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
(JKI) - Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik**

Förderkennzeichen:

22018208 bzw. 08NR182

Laufzeit:

01.12.2008 bis 31.05.2012

Datum der Veröffentlichung:

Gefördert durch:



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhaltsverzeichnis

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

1.1 Entwicklung einer hochsensitiven, praxisrelevanten Methode für den Nachweis von <i>M. anethi</i> an Fenchelfrüchten	2
1.2 Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Biologie von <i>M. anethi</i> und der Pathogenese	2
1.3 Erzeugung pilzfreier Fenchelpflanzen verschiedener Sorten durch Gewebekultur	2
1.4 Untersuchungen zur genetischen Variabilität von <i>M. anethi</i>	3

2. Stand der Technik

2.1 Biologie des Erregers	4
2.2 Samenübertragbarkeit	5
2.3 Bekämpfung durch Saatgutbehandlungen	6
2.4 Chemische Bekämpfung von <i>M. anethi</i>	6
2.5 Erprobte Resistenzprüf- und Erregernachweismethoden	6
a) Isolierungsmethode	7
b) Inokulationsmethode	7
c) Sichtbonitur	7
d) Serologische Nachweismethoden	7
e) Molekularbiologische Nachweismethoden	7
2.5 Zitierte Literatur	7

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 11

II Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse 12

1.1 Entwicklung und Standardisierung einer hochsensitiven praxistauglichen Methode zur Detektion des *M. anethi*-Befalls an Fenchelfrüchten

1.1.1 Entwicklung einer PCR-Methode

1.1.1.1 Stand der Technik 13

1.1.1.1.1 Isolierung von DNA 13

a) Material und Methoden 13

b) Ergebnisse 14

1.1.1.1.2 Entwicklung hochspezifischer, selektiv amplifizierender Primer 21

1.1.1.1.2.1 Testung der etablierten Primer 21

a) Material und Methoden 21

b) Ergebnisse 22

1.1.1.1.2.2 Entwicklung neuer Primer 25

a) Material und Methoden 25

b) Ergebnisse 26

1.1.1.2 Ausblick 29

1.1.1.3 Zitierte Literatur 30

1.1.2 Optimierter semi-quantitativer PTA-ELISA	
1.1.2.1 Einleitung	33
1.1.2.2 Material und Methoden	33
1.1.2.3 Ergebnisse	34
1.1.2.3.1 Feststellung einer repräsentativen Fruchtcharge	34
1.1.2.3.2 Fruchtprobenaufbereitung	35
1.1.2.3.3 Testablauf des semi-quantitativen PTA-ELISA	36
1.1.2.3.4 Verrechnungsschema für die Messwerte	38
1.1.2.3.5 Überprüfung der Genauigkeit der PTA-ELISA-Werte	40
1.1.2.3.6 Beispielsberechnung der Pilzkonzentration	42
1.1.2.3.7 Eignung des PTA-ELISA zum Feinnachweis von <i>M. anethi</i>	45
1.1.2.3.8 Vergleich der Testempfindlichkeit von PTA-ELISA und Amplifikations-ELISA	47
a) Material und Methoden	47
b) Ergebnisse	48
1.1.3 Gesamtfazit Methodenentwicklung zum Erregernachweis	50
1.1.4 Zitierte Literatur	51
1.2 Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Biologie und der Pathogenese von <i>M. anethi</i>	
1.2.1 Einleitung	52
1.2.2 Material und Methoden	52
1.2.3 Ergebnisse	52
1.2.3.1 Erregerlokalisierung im Pflanzengewebe	52
1.2.3.2 Nachweis in befallenen Blättern	52
1.2.3.3 Erregerausbreitung im latenten Stadium	54
1.2.3.4 Erregerlokalisierung an und in Früchten	61
1.2.3.5 Befallsquantifizierung bei Fenchelfrüchten	65
1.2.4 Zitierte Literatur	67
1.3 Anlage und Auswertung von Feldversuchen	
1.3.1 Einleitung	68
1.3.2 Material und Methoden	68
1.3.3 Ergebnisse	71
1.3.3.1 Feldversuche QLB und KAD 2009	71
1.3.3.1.1 Feldversuch QLB 2009	71
1.3.3.1.1.1 Epidemische Befallsentwicklung	71
1.3.3.1.1.2 Doldenstielbefall und Abreife	74
1.3.3.1.1.3 Fruchtbefall	76
a) Sichtbonitur des Ausgangssaatgutes	77
b) PTA-ELISA Befallsbonitur des Ausgangssaatgutes	78
c) Sichtbonitur des Erntegutes	79
d) PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	80
1.3.3.1.2 Feldversuch KAD 2009	82
1.3.3.1.2.1 Epidemische Befallsentwicklung	82
1.3.3.1.2.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	82
1.3.3.1.3 Fazit der Feldversuche QLB und KAD 2009	83

1.3.3.2 Feldversuche QLB und KAD 2010-2011	91
1.3.3.2.1 Feldversuch QLB 2010	92
1.3.3.2.1.1 Epidemische Befallsentwicklung	92
1.3.3.2.1.2 Ertrag	93
1.3.3.2.1.3 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	94
1.3.3.2.2 Feldversuch KAD 2010	96
1.3.3.2.2.1 Epidemische Befallsentwicklung	96
1.3.3.2.2.2 Ertrag	97
1.3.3.2.2.3 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	98
1.3.3.2.3 Feldversuch QLB 2011	99
1.3.3.2.3.1 Epidemische Befallsentwicklung	99
1.3.3.2.3.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	100
1.3.3.2.4 Feldversuch KAD 2011	101
1.3.3.2.4.1 Epidemische Befallsentwicklung	101
1.3.3.2.4.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes	102
1.3.3.2.5 Fazit der Feldversuche QLB und KAD 2010-11	103
1.3.3.2.5.1 Vergleich der Feldversuche (2010-11)	103
1.3.3.2.5.2 Fazit Fruchtbonituren (2010-11)	106
1.3.4 Zitierte Literatur	111
1.4 Einsatz der Gewebekultur zur Erzeugung unbefallener Fenchelpflanzen aus dem bestehenden Fenchelsortenspektrum	
1.4.1 Einleitung	112
1.4.2 Material und Methoden	113
1.4.3 Ergebnisse	113
1.4.3.1 Desinfektionsbehandlung	113
1.4.3.2 Mediumzusammensetzung und Kulturführung	114
1.4.3.3 Pflanzenentwicklung und Vermehrung	114
1.4.4 Ausblick	115
1.4.5 Zitierte Literatur	115
1.5 Agarplattentest zur Ermittlung der Direktwirkung von Fungiziden	
1.5.1 Einleitung	117
1.5.2 Material und Methoden	117
1.5.3 Ergebnisse	118
1.5.4 Zusammenfassung	119
1.5.5 Zitierte Literatur	124

1.6 Sammlung von <i>M. anethi</i>-Isolaten und erste Untersuchungen zu möglicher genetischer Diversität des Erregers	
1.6.1 Einleitung	127
1.6.2 Material und Methoden	127
1.6.2.1 Anlage einer Isolatesammlung	127
1.6.2.2 DNA-Isolierung	128
1.6.2.3 PCR mit ITS-Primern	128
1.6.2.3.1 Primer ITS 1F und ITS 4	128
1.6.2.3.2 Primer NS1 und EF3	128
1.6.2.3.3 Enzymverdau mit Hinfl	128
1.6.2.4 BOX-PCR	128
1.6.3 Ergebnisse	129
1.6.3.1 Anlage einer Isolatesammlung	129
1.6.3.2 DNA-Isolierung	129
1.6.3.3 PCR mit den Primern ITS 1F und ITS 4	129
1.6.3.4 PCR mit Primern: NS1 und EF3	131
1.6.3.5 Box-PCR	132
1.6.4 Ausblick	133
1.6.5 Zitierte Literatur	133
2. Verwertung	134
3. Veröffentlichungen	135
3.1 Vorträge	135
3.2 Poster	135
3.3 Veröffentlichungen	136

I. Ziele

1. Aufgabenstellung

Der pilzliche Erreger *Mycosphaerella anethi* (anamorph *Passalora punctum*) führt im Arzneifenchelanbau (*Foeniculum vulgare* Mill.) seit ca. 20 Jahren zu großen Ertragsausfällen. Die Situation hat sich in den letzten Jahren dramatisch verschärft; in den meisten Anbaugebieten kommt es regelmäßig zu hohen Verlusten bis hin zum Totalausfall, so dass der traditionsreiche deutsche Anbau insgesamt akut gefährdet ist. Falls es nicht gelingt, eine effektive Bekämpfungsstrategie zur Eindämmung der Krankheit zu entwickeln, kann die Produktion dieser Arzneipflanze nicht dauerhaft wirtschaftlich gestaltet werden.

Zielsetzung des Projekts war es, durch die Entwicklung und Standardisierung einer praxistauglichen Methode zur Detektion des *M. anethi*-Befalls an Handelsware und Saatgut einen substantiellen Beitrag zur Sicherung des kommerziellen Fenchelanbaus (konventionell und ökologisch) in Deutschland zu leisten. Ein einheitliches Bewertungssystem soll die Selektion von befallsarmem bzw. -freiem Saatgut ermöglichen und zur Verbesserung der Konsumqualität von Arzneifenchel beitragen. Die Charakterisierung der vorhandenen Hochleistungssorten bezüglich ihrer genetischen Prädisposition für Saatgutbefall mit *M. anethi* wird die Sortenwahl vereinfachen und damit Ertragsausfälle vermeiden helfen.

Die Ergebnisse der bisherigen mykologischen und epidemiologischen Untersuchungen von *M. anethi* an Arzneifenchel in der Arbeitsgruppe, bildeten die Ausgangsbasis sowohl für die weitere Charakterisierung dieses experimentell sehr schwierig zu handhabenden Pathosystems als auch für die Entwicklung der dringend erforderlichen praxisrelevanten Techniken zum Nachweis des Erregers. Folgende Aufgaben sollten im Rahmen des Forschungsvorhabens bewältigt werden:

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

- Entwicklung von empfindlichen, sicheren und möglichst einfachen Methoden zur Erfassung und Quantifizierung des Fruchtbefalls mit *M. anethi* (PTA-ELISA, RT-PCR)
- Vergleich unterschiedlicher Chargen von Früchten hinsichtlich des Befalls

1.2 Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Biologie von *M. anethi* und der Pathogenese

- mikroskopische Erregerlokalisierung im Fruchtgewebe
- Ermittlung und Bewertung der Infektionswege bei Früchten und Jungpflanzen
- Durchführung von epidemiologischen Untersuchungen zur räumlichen Ausbreitung der Konidien innerhalb und außerhalb eines Fenchelbestandes
- Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit der Befallsfreiheit von Pflanzen im Bestand

1.3 Erzeugung pilzfreier Fenchelpflanzen verschiedener Sorten durch Gewebekultur

- Untersuchungen zur Erzeugung von befallsfreiem Sortenbasismaterial
- sterile Vermehrung von befallsfreien Pflanzen von Hochleistungssorten

1.4 Untersuchungen zur genetischen Variabilität von *M. anethi*

- Aufbau und Erhaltung einer Isolatesammlung
- Schaffung methodischer Voraussetzungen zur Differenzierung von Isolat
- Erste Untersuchungen zur Ermittlung genetischer Diversität

2. Stand der Technik

Nachfolgend werden der Stand der Wissenschaft zu Projektbeginn (2008) und die zu erwartenden Wettbewerbsvorteile durch den erfolgreichen Abschluss des Projektes zusammengefasst dargestellt.

Der pilzliche Erreger an Fenchel ist in der Praxis unter der Bezeichnung *Mycosphaerella anethi* (Petzoldt 1989, 1990, Dehe et al. 2003), *Ramularia foeniculi* (Sibilia 1932, Baur und Heller 2002, Koch et al. 2002) bzw. als *Cercosporidium punctum* (Sisto 1983, Varvaro et al. 1998, Krauthausen und Kreiselmeyer 2002) oder *C. foeniculi* (Bedlan 1999, Crüger et al. 2002) bekannt. Im Abschlussbericht wird die nach Holliday (1998) gültige Bezeichnung *M. anethi* Petr. verwendet. Der Name *Passalora punctum* (Holliday 1998) ist in der internationalen Literatur für das konidiale Stadium unbekannt, daher wurde ausschließlich der Name *M. anethi* verwendet, was botanisch nicht korrekt ist, den Bericht aber leichter lesbar machen soll.

Massive Ertragsausfälle in der Produktion von Fenchel durch Befall mit *M. anethi* werden nicht nur aus Deutschland, sondern auch aus Anbaugebieten in Südfrankreich (Bougeard und Vegh 1980), Italien (Noviello et al. 1976, Sisto 1983, Varvaro et al. 1998), Österreich (Baur und Heller 2002, Koch et al. 2002, Krauthausen und Kreiselmeyer 2002), Polen (Plescher 1982), der Ukraine (Komirnaja 1952), Ungarn (Simay 1989), Rumänien (Bougeard und Vegh 1980, Plescher 1982) und Jugoslawien (Kisgeci 1999) berichtet.

Durch die bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen liegen am JKI momentan - auch im europäischen Vergleich - die meisten mykologischen und epidemiologischen Erfahrungen im Umgang mit diesem Pathosystem vor. Dieser Wettbewerbsvorteil soll auch zukünftig genutzt werden, um die deutsche Produktion von Arzneifenchel zu sichern und Perspektiven für die schrittweise Erweiterung zu entwickeln.

2.1 Biologie des Erregers

M. anethi verursacht eine Blatt- und Stängelanthraknose an Arzneifenchel, die zu hohen Ertragsverlusten und Qualitätsverminderungen durch Mycel- und Konidienbildung an den Fruchtoberflächen führen kann. Der Pilzbefall wird erst in den Sommer- und Herbstmonaten (Mai bis Oktober) durch die Bildung zahlreicher Konidienlager an den untersten Blättern der ein- und zweijährigen Pflanzen sichtbar. Die Konidienbildung setzt immer zeitgleich mit dem Blühbeginn des Fenchels ein. Die befallenen Blätter verfärben sich infolge des Befalls zunächst gelblich und sterben schließlich unter Braunfärbung ab. Das Fortschreiten der Infektion führt zu einem beschleunigten etagenweisen Absterben aller Blätter; *M. anethi* geht danach auf die Dolden über. Die hohen Ertragsausfälle werden durch eine Verminderung der Photosyntheseleistung als Folge vorzeitiger Blattverluste und durch direkte Gewebeschädigung während der Fruchtbildung verursacht. Problematisch ist die sehr lange natürliche Inkubationszeit des Erregers, der nach der Aussaat Anfang April erst Anfang August an der blühenden Pflanze Krankheitssymptome verursacht.

In einem vorangegangenen Projekt konnten in der Arbeitsgruppe die Identität des Erregers abgeklärt und die grundlegende Methodik im Umgang mit *M. anethi* erarbeitet werden. Während dieser Zeit wurde die besondere Problematik im Umgang mit der Pflanze und dem Erreger, der bis 1999 als nicht *in vitro* kultivierbar galt, deutlich. *M. anethi* unterscheidet sich schon im äußeren Erscheinungsbild und in seiner sehr festen Mycelkonsistenz erheblich von anderen Schadpilzen. Er wächst in Kultur extrem langsam und bildet daher nur sehr wenig Ausgangsmaterial für not-

wendige Laboruntersuchungen. Da trotz aller Bemühungen *M. anethi* in Kultur bislang kaum Konidien bildet, müssen weitere Kulturmedien auf ihre Eignung zur Sporulationsverbesserung geprüft werden. Nur mit ausreichenden Konidienmengen lassen sich Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen gezielt inokulieren, was bei erfolgreicher Infektion und Verfügbarkeit unterschiedlicher Isolate die Möglichkeit eröffnet, erstmals die genetische Variabilität von *M. anethi* genauer zu analysieren. Diese Untersuchungen waren ein Schwerpunkt des abgeschlossenen Vorhabens. Nach bisheriger Kenntnis befällt der Pilz neben Fenchel auch Dill, Petersilie und Sellerie. Ob weitere Vertreter der Familie *Apiaceae* zum Wirtskreis gehören und möglicherweise wildwachsende Arten als Überhälter und Infektionsquellen dienen, ist nicht bekannt. Auch die aus epidemiologischer Sicht sehr wichtige Frage der Wirtsspezifität des Erregers (*formae speciales*) ist noch unerforscht. Dieser Aspekt kann erhebliche praktische Konsequenzen haben. Sofern sich bestätigen sollte, dass der an Arzneifenchel vorkommende Pilz auch andere Arten aus der Familie *Apiaceae* befällt, dürften diese Kulturen nicht auf den gleichen Flächen oder in unmittelbarer Nachbarschaft von Fenchel angebaut werden. Die im Projekt formulierten Aufgaben sollten zum großen Teil mit molekularen, d.h. PCR-gestützten Methoden erfolgen. Hierzu lagen zu Beginn der Arbeiten bereits erste Erfahrungen und Ergebnisse vor, die positive Ansätze erkennen ließen.

2.2 Samenübertragbarkeit

Die Samenübertragbarkeit von *M. anethi* war bisher umstritten. Erst durch frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte diese Eigenschaft des Erregers zweifelsfrei nachgewiesen werden. Bereits während der Fruchtentwicklung, kurz nach der Blüte, war das Erregermycel am Endospermgewebe (d. h. im Nährgewebe des Keimlings) sowohl mittels PCR als auch mit einem polyklonalen Antiserum nachweisbar. Äußerliche Symptome an den Früchten wurden nicht immer ausgeprägt. Nach heutigen Vorstellungen kann der Pilz die Früchte sowohl durch das Einwachsen des Mycels über die Doldenstiele als auch über die Narben der Blüten infizieren. Durch das Einwachsen des Mycels während der Keimung erfolgt eine latente Infektion des Keimlings. Das Mycel konnte von der Aussaat bis zur Blüte in Wurzeln, Stängeln, Blattstielen, Blättern und Doldenstielen - noch vor dem Erscheinen von Symptomen - nachgewiesen werden. Nach der Aussaat von infiziertem Saatgut verursachte der Erreger zunächst über eine Dauer von ca. 4 Monaten keine Symptome oder Wuchsveränderungen an latent infizierten Pflanzen, da das hauptsächliche Mycelwachstum von *M. anethi* in den äußeren Epidermisschichten stattfand, wo bei Fenchel größere natürliche Zwischenräume existieren. Erst die zahlreichen reifen Konidienlager durchbrachen die Epidermis und wurden sichtbar. Das Wachstum im Gewebeinneren schädigte die Pflanze nicht bevor die epidemische Phase mit der Konidienbildung begann. Daher wurde bisher angenommen, dass die Jungpflanzen erst auf dem Feld spontan infiziert werden.

In Feldbeständen traten die Erstbefallssymptome immer zeitgleich bei allen Pflanzen auf, ohne Befallsherdbildung. Nach den Ergebnissen erster PCR-Untersuchungen waren einzelne Pflanzen im Keimlingsstadium aber auch befallsfrei. Ob derartige Pflanzen aus einer Charge gezielt ausgelesen und pathogenfrei kultiviert werden können, war in weiteren Untersuchungen zu klären. Dieses musste einhergehen mit der Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit und -sicherheit der eingesetzten PCR-Methoden. Zur Bedeutung und zum Ausmaß der Samenübertragbarkeit bestand daher noch umfangreicher Forschungs- und Entwicklungsbedarf.

2.3 Bekämpfung durch Saatgutbehandlungen

M. anethi ist durch das ins Fruchtgewebe eingewachsene Mycel gut gegen Desinfektionsmaßnahmen geschützt; zusätzlich kann die Fruchtoberfläche durch ihre wellpappeartige Struktur nur schwer vollständig benetzt werden. Nach dem positiven Mycelnachweis im Endospermgewebe erschien eine äußerliche Fruchtbehandlung (Beizen, Inkrustierung, Desinfektionen etc.) wenig erfolgsversprechend was sich experimentell auch bestätigte (Bougeard und Vegh 1980, Dehe et al. 2003, Taubenrauch 2007). Eine Warmwasserbeize war ebenfalls ungeeignet, da sie die Keimfähigkeit der Samen drastisch verringerte, den Erreger aber nicht abtötete (Kretschmer 1999, Taubenrauch 2007). Bisher konzentrierte sich die Bekämpfung des Pilzes deshalb auf die Fungizidbehandlung der Fenchelbestände zum Zeitpunkt des Auftretens erster Blattsymptome. Durch den erstmaligen Nachweis der Samenübertragbarkeit hat sich die Situation völlig verändert; es bestand dringender Forschungsbedarf zur Entwicklung von Methoden zur Verminderung der Samen- und Erstinfektionen von Jungpflanzen. Bisher fehlte eine praktikable Methode zum Nachweis latenter Keimlingsinfektionen.

2.4. Chemische Bekämpfung von *M. anethi*

Unsere bisherigen Bekämpfungsversuche zu Forschungszwecken waren mit dem systemischen Fungizid „Folicur“ durchgeführt worden, welches im Fenchelanbau nicht zugelassen ist. Bei den behandelten Parzellen waren während der epidemischen Phase des Erregers (ab dem Blühbeginn) nur geringe Blattschädigungen durch Konidienlager erkennbar. Völlige Befallsfreiheit der Pflanzen war jedoch nicht zu erreichen; infolgedessen wurden auch die Früchte infiziert. Das freigegebene Fungizid „Ortiva“ zeigte nach Aussagen der Projektpartner aus der Praxis keine gute Wirkung zur Verminderung und Verzögerung des Befalls.

Bisher fehlt damit ein Fungizid, welches den Samenbefall unterbindet und den Infektionskreislauf durchbricht. Für den ökologischen Anbau, der Fenchel als Kinder-tee vermarktet, fehlt seit vielen Jahren eine geeignete Bekämpfungsstrategie. Der Öko-Anbau war durch zu hohe Ertragsausfälle nicht mehr wirtschaftlich. Deshalb bestand auch auf diesem Gebiet großer Forschungsbedarf, da mit einer geeigneten Nachweismethode zum quantitativen Fruchtbefall in dieser Sparte zahlreiche neue Erkenntnisse zu erwarten waren. Die Erprobung und Auswahl eines geeigneten Wirkstoffs sowie auch alternativer Mittel zur Verminderung des Mycelwachstums würde damit erleichtert werden und helfen, erstmals für dieses Pathosystem eine Schadschwelle zu definieren und daraus den Zeitpunkt einer notwendigen Behandlung abzuleiten. Die finanziellen Vorteile lägen auf der Hand, da die Wirksamkeit der eingesetzten Mittel unmittelbar durch den Befallsgrad des Ernteguts sichtbar würde.

2.5 Erprobte Resistenzprüf- und Erregernachweismethoden

Im Fenchelsortiment gibt es bisher keine Hinweise auf Resistenzquellen bezüglich *M. anethi*. Mit der Entwicklung einer Methode zum quantitativen Nachweis des Erregers in Früchten könnten zukünftig genetische Ressourcen auf Anfälligkeitsunterschiede geprüft werden. Auch hierdurch entstünde ein entscheidender wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Wettbewerbsvorteil.

Durch die mehrjährigen Forschungsarbeiten wurden vielfältige Erfahrungen im Umgang mit Pilz und Pflanze gesammelt und ein Methodenrepertoire entwickelt, so dass ausgezeichnete Bedingungen für die zügige Inangriffnahme und die erfolgreiche Realisierung des Vorhabens bestanden.

a) Isolierungsmethode

M. anethi ist ein experimentell schwer handhabbarer Pilz der in der Literatur als nicht auf künstlichem Medium zu kultivieren galt. Im Rahmen früherer Arbeiten war es uns gelungen, differenzierte experimentelle Bedingungen für die erfolgreiche Isolierung des Erregers aus unterschiedlichen Pflanzenteilen (Stiel, Blätter, Früchte) und seine dauerhafte Kultur herauszuarbeiten. Hierdurch wurde es möglich, eine umfangreiche Isolatekollektion anzulegen, die für die weiteren Forschungsarbeiten zur Verfügung stand und schrittweise erweitert werden sollte.

b) Inokulationsmethode für Klimakammer-, Gewächshaus- und Feldversuche

Das Wachstum von *M. anethi* ist in der in vitro Kultur sehr langsam und die Konidienbildung gering, sodass Inokulationen für Resistenztestungen bisher nur mit natürlich infiziertem Blattmaterial möglich waren. Trotz einiger Nachteile hat sich dieses Inokulationsverfahren in den bisherigen Arbeiten bewährt. Durch die Praxispartner im Projekt standen ausreichende Mengen an Inokulationsmaterial für Versuche zur Verfügung, die damit kurzfristig aufgenommen werden konnten.

c) Sichtbonitur

Zur exakten Erfassung der Befallsstärke während der epidemischen Phase des Erregers lag zu Projektbeginn bereits eine an Arzneifenchel entwickelte und erfolgreich angewandte Scannerboniturmethode mit symptomspezifizierter Bildauswertung vor. Auf deren Grundlage war für eine einheitliche Bonitur größerer Pflanzenzahlen ein vereinfachtes Boniturschema entwickelt worden, welches die Schadeinschätzung bei unterschiedlichen Wuchstypen von Fenchel erlaubt und diese Bewertung erleichtert. Dieses Bonitursystem sollte die Befallsbewertung der Feldpflanzen in der epidemischen Phase des Erregers vereinfachen. Neben der Befallsbewertung des Erntegutes sollten diese ermittelten Daten zur Wissenserweiterung in diesem Pathosystem beitragen.

d) Serologische Nachweismethoden

Zum serologischen Nachweis des Erregers waren in vorangegangenen Arbeiten ein PTA-ELISA und ein DTBIA (direct tissue blot immuno assay) mit JKI-eigenen polyklonalen Antiseren etabliert worden. Mit dem DTBIA konnte auch latenter Pilzbefall in Pflanzen und Früchten erfasst werden. Auf dieser Grundlage wurden in ersten Versuchen als befallsfrei bewertete Jungpflanzen bereits 6 Wochen nach der Aussaat selektiert, welche anschließend in einer Klimakammer kultiviert und regelmäßig auf ihren Gesundheitsstatus überprüft wurden. Es waren jedoch wesentlich umfangreichere, systematische Untersuchungen notwendig, um die Potenzen dieser Strategie (z.B. Nachweissicherheit und -empfindlichkeit) für die schrittweise, perspektivische Gesundung des Fenchelsaatgutes für den praktischen Anbau auszuloten. Speziell zur Bewertung von Saatgutchargen sollte der Test erweitert und optimiert werden.

e) Molekularbiologische Nachweismethoden

Die Extraktion genomischer DNA von *M. anethi* ist im besonderen Maße schwierig und war bisher nur in geringer Menge gelungen. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen musste das Extraktionsverfahren vereinfacht und hinsichtlich der Ausbeute und Reinheit der Präparate deutlich effektiver gestaltet werden. Für die Amplifikation von Genomfragmenten war bereits ein spezifisches Primerpaar entwickelt worden, mit dem sich auch latenter Frucht- und Pflanzenbefall sicher nachweisen ließ. Hierdurch konnten einige Fragestellungen, wie die grundsätzliche

Samenübertragbarkeit sowie die latente Präsenz des Pilzes bereits geklärt werden. Dennoch lagen zu Projektbeginn immer noch wenige Daten zur Epidemiologie von *M. anethi* vor; es bestand erheblicher Forschungsbedarf.

DNA-basierte Analysen eröffnen im konkreten Fall mehr Möglichkeiten für die Differenzierung und Klassifizierung von Isolaten aus unterschiedlichen geografischen Regionen und ggf. von unterschiedlichen Wirtspflanzen, als es bei pilzlichen Pathogenen von serologischen Techniken zu erwarten ist. Neben dem Aspekt der Verbreitung der Krankheit durch infiziertes Saatgut musste geprüft werden, ob sich in den Hauptanbaugebieten besonders aggressive Formen herausgebildet haben, die für die extremen Ertragsausfälle in den letzten Jahren verantwortlich sind.

In der bisherigen Fenchelzüchtung werden noch keine modernen Labortechniken zur Befallseinschätzung von *M. anethi* und zur nachfolgenden Selektion von weniger anfälligen Genotypen eingesetzt. Die Auswahl der Kreuzungseltern erfolgte aufgrund von Sichtbonitur der Doldenstiele (Pank et al. 2007). Auf diesem Gebiet könnten sicherlich Ergebnisse erzielt werden, die die zukünftige Resistenzzüchtung nachhaltig befördern und auch international von Interesse sind. Die Krankheit ist auch in Südfrankreich (Bougeard und Vegh 1980), Italien (Noviello et al. 1976, Sisto 1983, Varvaro et al. 1998), Österreich (Baur und Heller 2002, Koch et al. 2002, Krauthausen und Kreiselmeier 2002), Polen (Plescher 1982), der Ukraine (Komirnjaja 1952), Ungarn (Simay 1989), Rumänien (Bougeard und Vegh 1980, Plescher 1982), Jugoslawien (Kisgeci 1999) und im Mittelmeerraum (Braun et al. 1999) beobachtet worden.

Im abgeschlossenen Projekt wurde besonders auf die Entwicklung einer PCR-gestützten Nachweismethode Wert gelegt, die bevorzugt an Saatgut eingesetzt werden sollte.

2.5 Zitierte Literatur

BAUR, R. und HELLER, W. (2002): Pflanzenschutzmittel für Knollenfenchel. Eidgenössische Forschungsanstalt Wädenswil (FAW). Version Dezember 2002. www.faw.ch

BEDLAN, G. (1999): Gemüsekrankheiten. 3. aktualisierte und erweiterte Auflage, Österreichischer Agrarverlag, Klosterneuburg

BOUGEARD, M. und VEGH, I. (1980): Étude préliminaire sur le cercosporidium punctum (Lacroix) Deighton - Agent de la «Cercosporidiose» du Fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Cryptogamie, Mycologie* 1, 205 - 221

BRANDENBURGER, W. (1985): Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

CRÜGER, G., BACKHAUS, G. F., HOMMES, M., SMOLKA, S. und VETTEN, H.-J. (2002): Pflanzenschutz im Gemüsebau. 4. völlig überarbeitete und erweiterte Auflage. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart

DEHE, M., FROSCH, M., GROHS, B. - M., KRUSCHE, M. und REICHARDT, I. (2003): Untersuchungen zur Kontrolle akuter Doldenerkrankungen des Fenchels durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. *Z. Arzn. Gew. Pfl.* 8, 79 - 82

HOLLIDAY, P. (1998): A Dictionary of Plant Pathology. 2. Ausgabe, Cambridge University Press, London, U.K.

HOPPE, B. (2005): Studie zum Stand des Anbaus von Arznei- und Gewürzpflanzen in Deutschland (2003) und Abschätzung der Entwicklungstrend in den Folgejahren. Abschlussbericht veröffentlicht in Kurzfassungen der Vorträge des 16. Bernburger Winterseminars

KISGECI, L. (1999): Anbau von Arzneipflanzen im ehemaligen Jugoslawien. Z. Arzn. Gew. Pfl. 4, 97 - 102

KOCH, W., HELLER, W. und HESS, E. (2002): Erstmals Fungizid bei Fenchel zugelassen:
Fenchelkrankheiten stellen Produktion vor neue Herausforderung. Der Gemüsebau / Le Maraicher 7, 4 - 7

KOMIRNAJA, O. N. (1952): Istoria razvitia *Cercospora depressa* (BERK. et BR.) VASSIL. na fenele. Uchjonye zapiski saratovskogo gos. Un-ta vyp. Botanicheskij, 35, 129 - 138

KRAUTHAUSEN, H. - J. und KREISELMAIER, J. (2002): *Cercosporidium punctum* an Fenchel. Gemüse 3, 8

KRETSCHMER, M. (1999): Optimale Keimtemperaturbereiche und Dormanz bei *Apiaceae* – Saatgut. Gemüse 9, 526 – 528

NOVIELLO, C., MARZIANO, F., ALOJ, B. und GARIBALDI, A. (1976): Osservazioni triennali sulle malattie del finocchio in Campania. Annali Fac. Sci. agr. Univ. Napoli 10, 259– 271

PANK, F., QUILITZSCH, R. und KRÜGER, H. (2007): Entwicklung und Charakterisierung von Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) mit verminderter *Myco-sphaerella*-Anfälligkeit. Arzn. Gew. Pfl. 4, 166 - 174

PETZOLDT, S. (1989): Zur Biologie und Schadwirkung des Erregers der Blatt- und Stengelanthraknose (*Mycosphaerella anethi* Petr.) am Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) - 1. Mitteilung. Drogenreport 3, 49 - 65

PETZOLDT, S. (1990): *Mycosphaerella anethi* - Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte. Boletus 14, 49 – 56

PLESCHER, A. (1982): Untersuchungen zur Ursache und Bekämpfungsmöglichkeit des Doldenbrandes bei Kümmel (*Carum carvi* L.) und anderer kultivierten Arznei- und Gewürzpflanzen der Familie *Umbelliferae*. Dissertation Humboldt Universität, Berlin

SIBILIA, C. (1932): Un parassita del finocchio. Boll. Staz. Path. Veg. Roma 12, 210 - 235

SIMAY, E. I. (1989): Fungi occuring on symptom-free leaves of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Novenyvedelem 25, 435 - 437

SISTO, D. (1983): *Cercosporidium punctum* (Lacroix) Deighton su finocchio (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *azoricum* Thell.) in Italia meridionale. Informatore Fitopatologico 7, 55 - 58

TAUBENRAUCH, K. (2007): Mykologische und epidemiologische Untersuchungen des Pathosystems *Mycosphaerella anethi* - Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Dissertation Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (http://www.tib.uni-hannover.de/spezialsammlungen/dissertationen/hannover/uebersichten/GGTSPU-styx.bba.de-31744-2017701-DAT/diss_07.pdf)

TAUBENRAUCH, K., GABLER, J., RABENSTEIN, F., PANK, F. und HAU, B. (2001): Erste Ergebnisse zur Sortenanfälligkeit von Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) gegenüber *Mycosphaerella anethi* Petr. Z. Arzn. Gew. Pfl. 6, 120 - 124

VARVARO, L., SANTINI, L. und BALESTRA, G. M. (1998): I principali parassiti nelle colture di finocchio. Informatore Agrario 54, 47 – 50

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Forschungsvorhaben wurde auf Wunsch und unter Mitarbeit der nachfolgenden Personen und Institutionen entwickelt:

- **Prof. Dr. Wolf-Dieter Blüthner**, N.L. Chrestensen Samenzucht und Produktion GmbH Erfurt, Witterdaer Weg 6, 99016 Erfurt
- **Dipl.-Ing. agr. Margit Dehe**, Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Kompetenzzentrum Gartenbau, Meckenheimer Str. 40, 53474 Rheinbach
- **Dr. Rolf Franke**, SALUS Haus GmbH & Co. KG, Bahnhofstraße 24, 83052 Bruckmühl
- **Dr. Hans-Jürgen Hannig**, Martin Bauer Group, Dutendorfer Straße 5 - 7, 91487 Vestenbergsgreuth
- **Prof. Dr. Bernhard Hau**, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover
- **Dr. Andreas Plescher**, Pharmaplant GmbH, Straße am Westbahnhof 4, 06556 Artern
- **Dr. Erika Schubert**, agrimed Hessen w. V., Oderstraße 38, 65468 Trebur
- **Dr. Birgit Grohs**, Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bürgerstraße 12, 53173 Bonn

Seitens der Kooperationspartner aus der Praxis wurde Fenchelmateriale unterschiedlicher Sorten und Herkünfte für die Untersuchungen innerhalb des Projektes zur Verfügung gestellt. Im Rahmen eines Unterauftrages wurden über 3 Jahre am Standort Klein-Altendorf durch das DLR Rheinpfalz parallel zum Standort Quedlinburg Feldversuche angelegt, betreut und in Kooperation ausgewertet.

II Ergebnisse

1. Erzielte Ergebnisse

1.1 Entwicklung und Standardisierung einer hochsensitiven praxistauglichen Methode zur Detektion des *M. anethi*-Befalls an Fenchelfrüchten

Mycosphaerella anethi ist der bedeutendste samenübertragbare pilzliche Schad-erreger im Produktionsanbau von Fenchel. Bisher gab es noch keine effektive Bekämpfungsstrategie zur Schadensminimierung. Beim Erscheinen der zahlreichen Konidienlager auf Blättern, Stängeln und Dolden war eine Fungizidbehandlung aufgrund der Wuchshöhe der Kultur und möglichen Fungizidrückständen in den Früchten nicht unproblematisch. Außerdem war nach einer Pflanzenschutzbehandlung ein zukünftiger starker pilzlicher Doldenbefall mit *M. anethi* nicht auszuschließen. Dem Anbauer blieb nur die genaue Überwachung des Befallsverlaufs, auf den er zur Schadenseindämmung lediglich mit einer früheren Ernte (Gründrusch) reagieren konnte. Je nach Befallsbeginn und Verlauf der Epidemie sowie der Anordnung der Dolden an den Pflanzen zeigten die Früchte sehr unterschiedliche Befallsstärken. Durch eine sehr zeitaufwändige Sichtbonitur von Fruchtchargen war eine Befallseinschätzung zwar möglich, erwies sich aber als sehr subjektiv und nicht praxistauglich.

Da der Erreger bei niedrigem Befallspotenzial schwärzliche Verkrustungen durch Mycelanhäufungen und Konidienbesatz an den Samen verursachte, handelte es sich nicht nur um ein Ertragsproblem des Anbauers, sondern es lag möglicherweise auch eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers vor.

Die andauernden mykologischen Probleme im Fenchelanbau können nur durch eine objektive, quantitative Methode zur Befallseinschätzung gelöst werden. Durch die erstmalige Quantifizierung des *M. anethi*-Befalls an Fruchtchargen sollte einerseits weniger stark infiziertes Material für den Produktionsanbau und den Konsum ausgelesen werden. Andererseits lassen sich durch die quantitative Erfassung des Erregers Bekämpfungsstrategien (Beizung, Fungizidbehandlungen, Anbaumaßnahmen) objektiv auf ihren Erfolg prüfen. Durch die genaue Erfassung des Frucht-befalls können Anbauer ihr Erntegut objektiv kontrollieren und den Erfolg ihrer pflanzenbaulichen Maßnahmen jährlich überprüfen. Auf diese Weise kann z. B. geklärt werden, ob eine Kupferspritzung den Befall tatsächlich verringert und die Anwendung rentabel ist.

Eine quantitative Nachweismethode für *M. anethi* stellt damit einen wesentlichen ersten Schritt zur Sicherung des kommerziellen Fenchelanbaus in Deutschland dar.

Außerdem sollte der Test zum besseren Verständnis des bisher kaum untersuchten Pathosystems beitragen. Mit einer Methode zum Feinnachweis des Erregers in Früchten, Pflanzenteilen und Boden lassen sich erstmals wichtige epidemiologische Fragestellungen, wie die mögliche Bodenübertragbarkeit von *M. anethi* sowie Zeitpunkt und Ausmaß der Fruchtfektionen an Dolden untersuchen und klären.

Im Vordergrund der Projektbearbeitung stand die Entwicklung einer PCR-Methode zur Detektion und Quantifizierung des Erregers in Früchten und Pflanzen. Durch die im Verlauf der Arbeiten deutlich werdenden erheblichen experimentellen Schwierigkeiten in der PCR, die sich durch Eigenheiten des Pathosystems ergaben (siehe DNA-Isolierung), wurde zusätzlich eine quantitative PTA-ELISA-Methode entwickelt. Sie sollte als alternative bzw. ergänzende Methode eine praxistaugliche Variante darstellen, die von Anbauern, Firmen und Pflanzenschutzämtern umgehend genutzt

werden kann. Die Methode wird an Herrn Dr. Hermann-Josef Krauthausen vom DLR Rheinpfalz übergeben und steht damit zukünftig allen Interessenten zur Verfügung.

1.1.1 Entwicklung einer PCR-Methode

1.1.1.1 Stand der Technik

M. anethi wurde bisher kaum wissenschaftlich untersucht, weil er in der Literatur als nicht auf künstlichem Medium zu kultivieren galt. Außerdem galt die Produktion von Fenchel, mit einem Anbauumfang von ca. 500 ha in Deutschland (Hoppe 2005), lange Zeit als unproblematisch.

In der bisherigen Fenchelzüchtung wurden noch keine modernen Labortechniken zur Selektion von weniger anfälligen Genotypen eingesetzt. Die Auswahl der Kreuzungseltern erfolgte ausschließlich aufgrund einer Sichtbonitur der Doldenstiele (Pank et al. 2007).

Es existiert eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich mit der molekularbiologischen Untersuchung anderer *Mycosphaerella*-Arten befassen, diese ließen sich aber nicht auf *M. anethi* übertragen (Taubenrauch 2007). Besondere Schwierigkeiten hatte in den bisherigen Untersuchungen zum Pathosystem die Extraktion genomischer DNA von *M. anethi* bereitet; die erzielten Ausbeuten waren sehr gering und die Reinheit der DNA-Präparate nicht optimal (Taubenrauch 2007). Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen sollte das Extraktionsverfahren vereinfacht und effektiver gestaltet werden. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Isolierungskits zahlreicher Anbieter vergleichend geprüft.

Für die Amplifikation eines Genomfragmentes von *M. anethi* war in der Vergangenheit bereits ein spezifisches Primerpaar entwickelt worden. Auf diese Weise konnte erstmals auch latenter Pilzbefall in Früchten und Pflanzenteilen sicher nachgewiesen werden. Hierdurch konnten einige Fragestellungen, wie die grundsätzliche Samenübertragbarkeit sowie die latente Präsenz des Pilzes bereits geklärt werden. DNA-basierte Analysen können im konkreten Fall mehr Möglichkeiten für die Differenzierung und Klassifizierung von Isolaten aus unterschiedlichen geografischen Regionen und ggf. von unterschiedlichen Wirtspflanzen eröffnen, als es bei pilzlichen Pathogenen von serologischen Techniken zu erwarten ist.

1.1.1.1.1 Isolierung von DNA

a) Material und Methoden

Als Hauptproblem für die Entwicklung einer spezifischen und empfindlichen genom-basierten Nachweismethode erwies sich die Isolierung der Pilz-DNA aus in vitro Kulturen des Pilzes, Fenchel Früchten und -pflanzen. Besonders bei gering und latent befallenem Pflanzenmaterial war die bisherige Menge zum Nachweis oft nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden, vergleichend zur bisherigen Praxis, 17 Kits von 14 kommerziellen Anbietern hinsichtlich der erzielten DNA-Ausbeute und -Reinheit verglichen (Tab. 1). Zusätzlich wurden alternative DNA-Isolierungsmethoden (u. a. PEX- (Jhingan 1992) und CTAB-DNA-Extraktion (Križman et al. 2006)) in zahlreichen Variationen erprobt. Zur Optimierung der Vorbehandlung der Proben (Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Trocknen, Gefrietrocknen) und zur Zerkleinerung des Materials (Mörsern, Kugelmühle) wurden ebenfalls umfangreiche Versuche durchgeführt. Für die weitere Aufreinigung der DNA-Präparate nach der Isolierung wurden zusätzlich 5 Kits erprobt (Tab. 1). Da das Ausgangsmaterial für die Extraktionen sehr heterogen war, mussten für Früchte, Pflanzenteile und Pilzkulturen jeweils eigene Testreihen durchgeführt werden.

Tab. 1: Verwendete DNA-Isolierungs- (oben) und Reinigungs-Kits (unten).

Bezeichnung	Firma
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
FastDNA® SPIN Kit for Soil	MP Biomedicals Life Sciences
GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit	Fermentas
GNOME® DNA KIT	MP Biomedicals
InnuSPEED Bacteria/Fungi DNA Kit	Analytik Jena AG
Invisorb Spin Plant Mini Kit	STRATEC Molecular GmbH
Master Pure Plant Leaf DNA Purification Kit	Biozym
Master Pure Yeast DNA Purification Kit	Biozym
Nucleon PhytoPure	GE Healthcare
peqGOLD Fungal DNA Mini Kit	peqlab Biotechnologie GmbH
Phire® Plant Direct PCR Kit	New England Biolabs GmbH
Puregene Kit for Yeast / Bact.	Qiagen
QuickExtract™ Seed DNA Extraction Solution	EPICENTRE
UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories
Yeast Cell Lysis Preparation Kit	MP Biomedicals
ZR Fecal DNA MiniPrep™	Zymo Research
ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™	Zymo Research
DNA Clean & Concentrator-5 Kit	Zymo Research
GENECLEAN® SPIN Kit	MP Biomedicals
NucleoSpin Extract II	Macherey - Nagel
OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit	Zymo Research
ZR Miniprep™ - Classic	Zymo Research

b) Ergebnisse

Die Aufbereitung des Materials zur DNA-Extraktion erwies sich als sehr zeitaufwändig. Für die Zerkleinerung des Materials war der Einsatz einer Kugelmühle (MM 300, Retsch) am geeignetsten, es wurden je 4 Nirostastahlkugeln (Ascubal) (Ø 3 mm) benötigt. Die Früchte trennten sich in ein feines Mehl aus der Fruchthülle und einen härteren, gummiartigen Endospermkern auf. Eine vollständige Zermahlung war mittels der Kugeln in einem Schritt nicht möglich. Da sich der Hauptanteil des Pilzes aber auf und in der Fruchthülle befand, wurde dieses Mehl verwendet. Endospermkerne mussten vor der nochmaligen Behandlung in der Kugelmühle gefroren und mit einem Hammer vorzerkleinert werden. Pflanzenteile mussten vor der Behandlung in der Kugelmühle zerquetscht und in Stücke geschnitten werden.

Grundsätzlich wurde deutlich, dass bei molekularbiologischen Untersuchungen von Mycel und Fenchelfrüchten die einsetzbare Probemenge mengenmäßig stark eingeschränkt war, weil das trockene Material die Puffer vollständig aufnahm und ein Überstand mit der gelösten DNA nicht mehr abzuzentrifugieren war. Da die Partikelgrößen der Fenchelfrüchte und des Mycels durch den Mahlvorgang in dieser Schwingmühle vorgegeben waren (< 5 µm), musste ein Kit gewählt werden, der auf eine größere Probenmenge anzupassen war. Dies garantierte einerseits die Weiterbearbeitung der Proben und andererseits die Testung einer für eine Fruchtcharge repräsentativen Probenmenge.

Bei Kits, wo eine Abtrennung der DNA über Säulen erfolgte, verstopften die Filter durch die breiige Frucht- bzw. Mycelmasse. Diese Kits schieden als unbrauchbar für dieses Pathosystem aus.

Unabhängig vom Anbieter und der ausgewiesenen Spezifik der verschiedenen Kits waren die extrahierten DNA-Mengen aus den Pilzkulturen im Wesentlichen gleich und äußerst gering. Es war daher anzunehmen, dass sich im Vergleich zu anderen

Pilzen, aus *M. anethi*-Kulturen generell nur geringe Mengen gewinnen lassen. Ein direkter Vergleich bestätigte diese Annahme (siehe Abb. 1). Aus drei Pilzreinkulturen (*M. anethi*, *Alternaria*, *Fusarium*), einer Pilzmischung (Mischung von Pilzen, die aus Fenchelfrüchten auswuchsen) und zwei Pflanzen-Pilzmischungen (infiziertes Knollenfenchelgewebe, *M. anethi* befallenes Fenchelfruchtmehl) (jeweils gleiche Mengen und Vorbehandlungen) wurde DNA nach demselben Protokoll isoliert und gereinigt. Es zeigte sich, dass, trotz erheblicher Variation zwischen den Einzelproben, das *M. anethi*-Mycel einen deutlich geringeren DNA-Gehalt aufwies als die Vergleichskulturen von *Alternaria* und *Fusarium*.

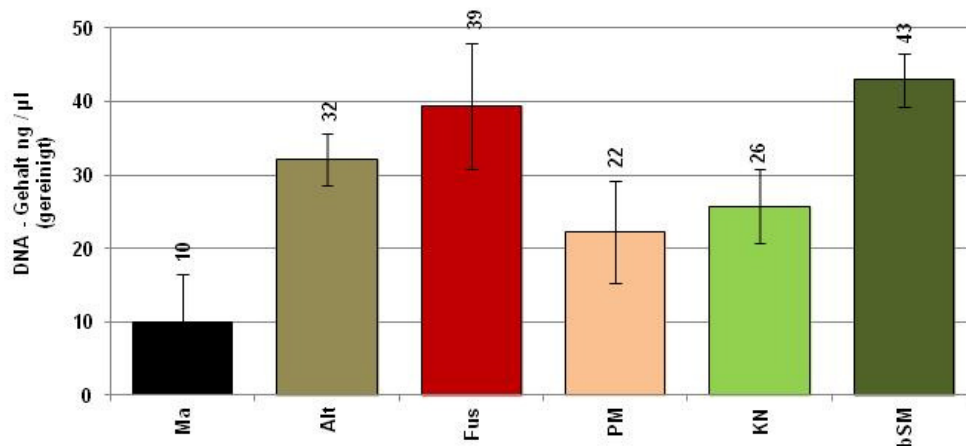


Abb. 1: DNA-Gehalt (ng/ µl) von je 6 gereinigten Präparationen aus Reinkulturen von *M. anethi* (Ma); *Alternaria* (Alt); *Fusarium* (Fus); einer Mischung von Pilzen, die aus Fenchelfrüchten auswuchsen (PM); von infiziertem Knollenfenchelgewebe (KN) und von mit *M. anethi* befallenen Fenchelfruchtmehl (bSM). Es wurde der Puregene Kit for Yeast/ Bact. Kit B (Qiagen) verwendet. Für die Extraktion wurde jeweils 0,4 g Pilz- (von der Kulturplatte) bzw. Pflanzenmaterial abgewogen.

Im Rahmen der anschließenden Arbeiten zur Optimierung der Bedingungen für die DNA-Gewinnung wurde der DNA-Isolierungskit der Firma Qiagen (Puregene Yeast/ Bact. Kit B) eingesetzt, da er aufgrund seines Baukastensystems am besten auf die Probeneigenschaften von Fruchtmehl einzustellen war. Nachfolgend ist das modifizierte Protokoll aufgeführt.

**Protokoll zur DNA-Extraktion mit dem Puregene Yeast /Bact. Kit B (Qiagen)
für *M. anethi*-Mycel, Fruchtmehl, Endospermkerne und Fenchelpflanzengewebe**

Probenvorbereitung

a) frisches *M. anethi*-Mycel von der Kulturplatte

- frisches Pilzmycel von der Kulturplatte mit einem Spatel abnehmen
- 0,4 g in 2,0 ml Tubes geben und mit 4 Nirostastahlkugeln (Ø 3 mm, Ascubal) bei -20 °C im Tiefkühlschrank einfrieren
- gefroren, ohne Flüssigkeit, in Kugelmühle (MM 300, Retsch) vorzerkleinern (30 Schwingungen pro sek, 5 min)
- Mycel leicht herunter zentrifugieren (Impuls 3 sek)

b) getrocknetes *M. anethi*-Mycel

- 0,1 g trockenes Mycel in 2,0 ml Tubes abwiegen und mit 4 Kugeln (Ø 3 mm) einfrieren
- gefrorene Proben ohne Flüssigkeit in Kugelmühle vorzerkleinern (30 Schwingungen pro sek, 5 min)
- Mycel herunter zentrifugieren (Impuls 3 sek)

c) trockene Fenchel Früchte

- ¼ Tube mit Fenchel Früchten füllen und mit 4 Kugeln (Ø 3 mm) in Kugelmühle (30 Schwingungen pro sek, 5 min) mahlen, Mahleinsätze wenden und nochmal mahlen (5 min)
- Endospermkerne mit feinem, handelsüblichen Metallsieb absieben
- 0,1 g trockenes Fruchtmehl abwiegen

d) Endospermmehl

- Endospermkerne mit 1 cm³ handelsüblichem Quarzsand und 3 Stahlkugeln (Ø 3 mm) von anhaftenden Fruchtmehlresten in der Kugelmühle reinigen (30 Schwingungen pro sek, 10 min, Mahleinsätze nach 5 min wenden)
- danach Sand absieben und Kerne im Wärmeschrank bei 37 °C rücktrocknen
- 0,1 g Kerne abwiegen, einfrieren und mit Hammer zerkleinern
- mit 5 Kugeln (Ø 3 mm) in der Kugelmühle mahlen (30 Schwingungen pro sek, 10 min, Mahleinsätze nach 5 min wenden)
- Mehl herunter zentrifugieren (Impuls 3 sek)

e) Fenchelpflanzenstücke oder Blätter

- Pflanzenteile präparieren, abwiegen (0,4 - 0,6 g) und in Folie einfrieren (-20 °C)
- in kleine Stücke schneiden und in einer Folie mit Hammer zerdrücken
- in ein 2,0 ml Tube mit 4 Kugeln (Ø 3 mm) geben und in Kugelmühle (30 Schwingungen pro sek, 10 min, Mahleinsätze nach 5 min wenden)

DNA Extraktion

- 600 µl **Lösung 1** + 3 µl **Lösung 2** zu der abgewogenen Probe geben
- Vortexen, bis eine homogene Masse entsteht, und 10 min quellen lassen
- 4 Kugeln in die Tubes geben (falls noch nicht enthalten) und in Kugelmühle (30 Schwingungen pro sek, 2 min) mischen
- Standzeit ca. 60 - 90 min bei 37 °C im Wärmeschrank (Kleinwärmeschrank, ThermoElectron)
- Zentrifugieren (14.000/ Upm, 5 min)
- Überstand abpipettieren und verwerfen
- 600 µl **Lösung 3** zugeben und Pellet im Tube lösen
- 200 µl **Lösung 4** zugeben
- Vortexen (20 sek) oder in Kugelmühle (30 Schwingungen pro sek, 2 min) mischen
- Zentrifugieren (14.000/ Upm, 5 min))
- flüssigen Überstand in neues Tube (2,0 ml) abpipettieren
- Zentrifugieren (14.000/ Upm, 5 min)
- 600 µl DNA-Extraktionslösung **durch Gaze** sauber abpipettieren in neues Tube (2,0 ml) (einige Teile des Mycels oder Fenchel schwimmen !)

Fällung mit Isopropanol

- DNA durch Zugabe von 1500 µl Isopropanol (100 %) fällen (Tube langsam und lange bewegen)
- Zentrifugieren (14.000/ Upm, 5 min)
- Überstand vorsichtig abgießen (Pellet löst sich sehr leicht)

Ethanolwaschung

- Pellet in 400 µl TdW (tridestilliertes Wasser) aufnehmen und vorsichtig lösen
- Zugabe von 1200 µl Ethanol (96,4 %, unvergällt) und Tube schwenken bis Lösung klar wird
- Zentrifugieren (14.000/ Upm, 5 min)
- Überstand abgießen (Pellet sichtbar an Wand)
- Pellet trocknen (Trockenschrank bei 37 °C) und, je nach Größe und Färbung, in 100 - 200 µl TdW aufnehmen und lösen (Kühlschrank über Nacht)
- DNA-Präparation mit Reinigungskit (GeneCleanSpin Kit, MP) nach Vorschrift säubern

Die DNA-Präparationen, speziell aus Früchten (Fenchel, Kümmel, Dill, Petersilie) und Pilzen (*Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*), waren in allen Fällen noch erheblich verunreinigt. Diese Verunreinigungen (bräunliche Verfärbungen), u. a. Melanine, die häufig in Pilzen enthalten sind, waren bereits mit bloßen Augen erkennbar (Abb. 2).

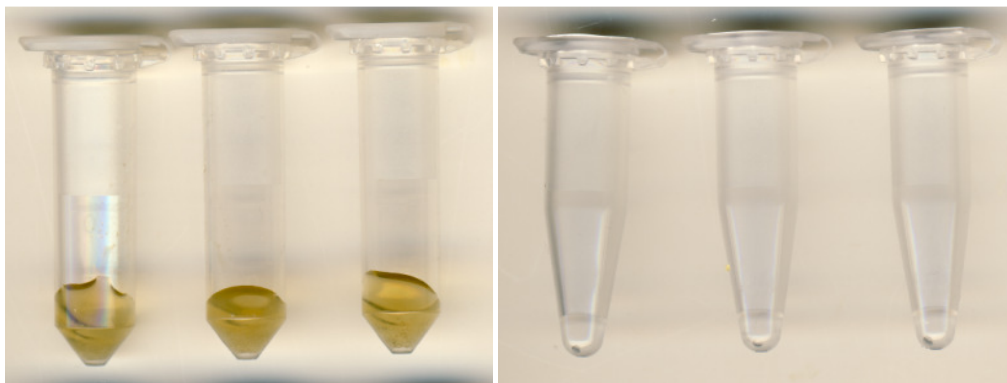


Abb. 2: DNA-Präparationen aus mit *M. anethi* befallenen Fruchtmehl vor (links) und nach (rechts) der Reinigung mit dem GENE CLEAN® SPIN Kit (Firma MP Biomedicals).

Die DNA-Präparationen konnten in dieser Form nicht für den PCR-Nachweis von *M. anethi* eingesetzt werden, da anstelle einer deutlichen Bande nur ein breiter Schmier im Agarosegel erschien. Diese Verunreinigungen, die vermehrt bei DNA-Präparationen aus Samen und Früchten entstehen können, sind aus der Literatur hinlänglich bekannt und führten zu modifizierten Protokollen für Samen (von Post et al. 2003, Chen et al. 2006, Kumar Mishra et al. 2008, Chen et al. 2009 Shahzadi et al. 2010, Abd-Elsalam et al. 2011) und handelsübliche Kits zur DNA-Präparation (z. B. Quick-Extract™ Seed DNA Extraction Solution, Epicentre®; ZR Plant/ Seed DNA MiniPrep™, Zymo Research), die besonders die Proteine und Öle entfernen. Melanin, welches mit großer Sicherheit bei Fenchelfrüchten (Ölgänge) und bei *M. anethi* (Mycel) vorkommt, gilt als besonders störend in der PCR (Bell et al. 1976, Tokousbalides et al. 1979, Wheeler 1983, Wheeler et al. 1985, Greenblatt und Wheeler 1986, Viviani et al. 1993, Kawamura et al. 1997, Islas-Flores et al. 2006, Choi 2011a und b), weil es die Aktivität der Taq-Polymerase blockiert (Eckhart et al. 2000).

Die Stärke der Verunreinigungen der extrahierten Präparationen wurden näher bestimmt (vergleichende Messung im UV-Spektrum mit λ -DNA, UV-Spektrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher)). Nach der Extraktion der DNA aus Pilzkulturen

lag der Gehalt zwischen 333 - 215 ng/ μ l, nach der Reinigung mit dem GeneClean-Spin Kit (MP) dagegen nur noch zwischen 2 - 53 ng/ μ l (Tab. 2, Abb. 3 und 4).

Tab. 2: DNA-Gehalt (ng/ μ l) von Pilzproben und mit *M. anethi* befallenen Pflanzenproben ohne und nach der Aufreinigung mit GeneCleanSpin Kit (MP) (Messung im UV-Spektrum mit NanoDrop Spectrophotometer, Thermo Fisher). Zur DNA-Extraktion wurde der Puregene Kit for Yeast/ Bact. Kit B (Qiagen) verwendet, dazu wurde die DNA aus jeweils 0,4 g Pilzmaterial bzw. Pflanzenmaterial extrahiert (je 6 Proben).

Varianten	DNA-Gehalt ohne Aufreinigung (ng/ μ l)		DNA-Gehalt nach Aufreinigung (ng/ μ l)	
	Min-Gehalt	Max-Gehalt	Min-Gehalt	Max-Gehalt
<i>M. anethi</i> -Kultur	191	215	2	20
<i>Alternaria</i> -Kultur	333	483	27	37
<i>Fusarium</i> -Kultur	195	294	28	53
Mischung von Pilzen, die aus Fenchelfrüchten auswuchsen	153	201	10	32
infiziertes Knollenfenchelgewebe	45	104	20	35
befallenes Fenchelfruchtmehl	383	759	39	50

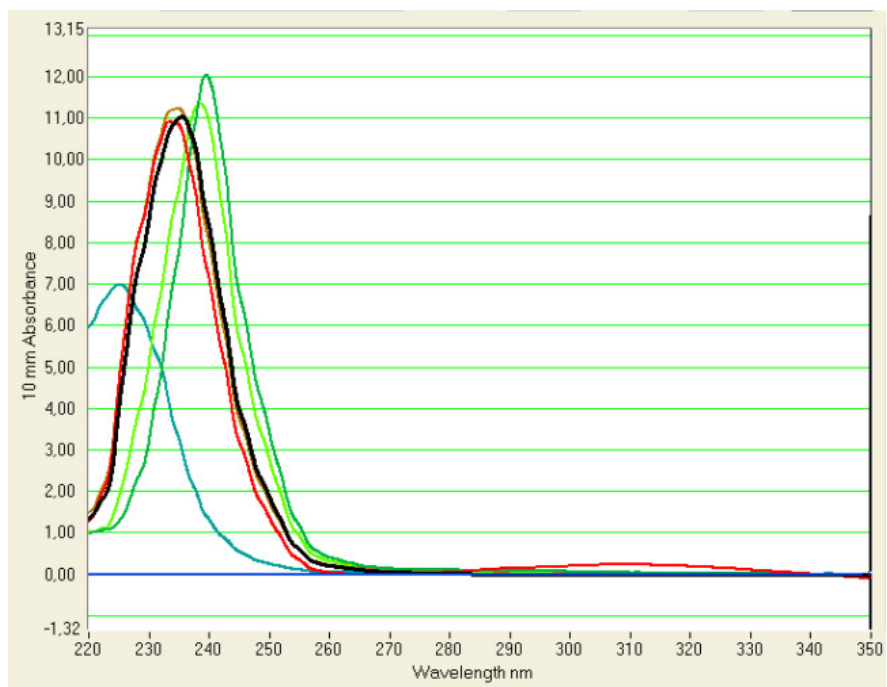
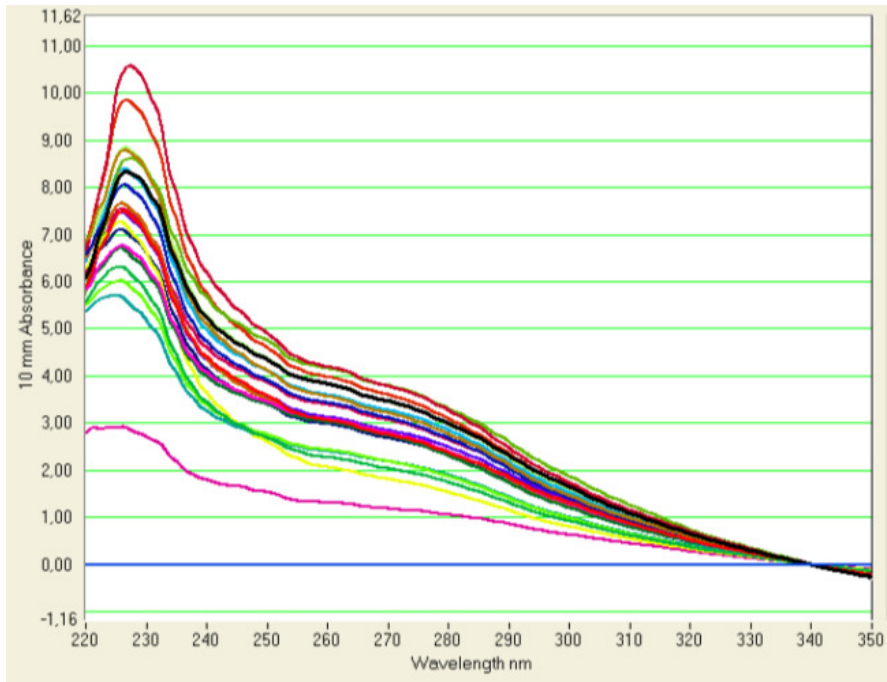


Abb. 3: Wirkung der DNA-Reinigung auf Präparationen von *M. anethi*-Kulturen (Ausgangsmenge für die Extraktion 0,4 g): Messung des Gehaltes mit UV-Spektrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher) vor (oben) und nach (unten) der Reinigung mit GENE CLEAN® SPIN Kit (MP Biomedicals).

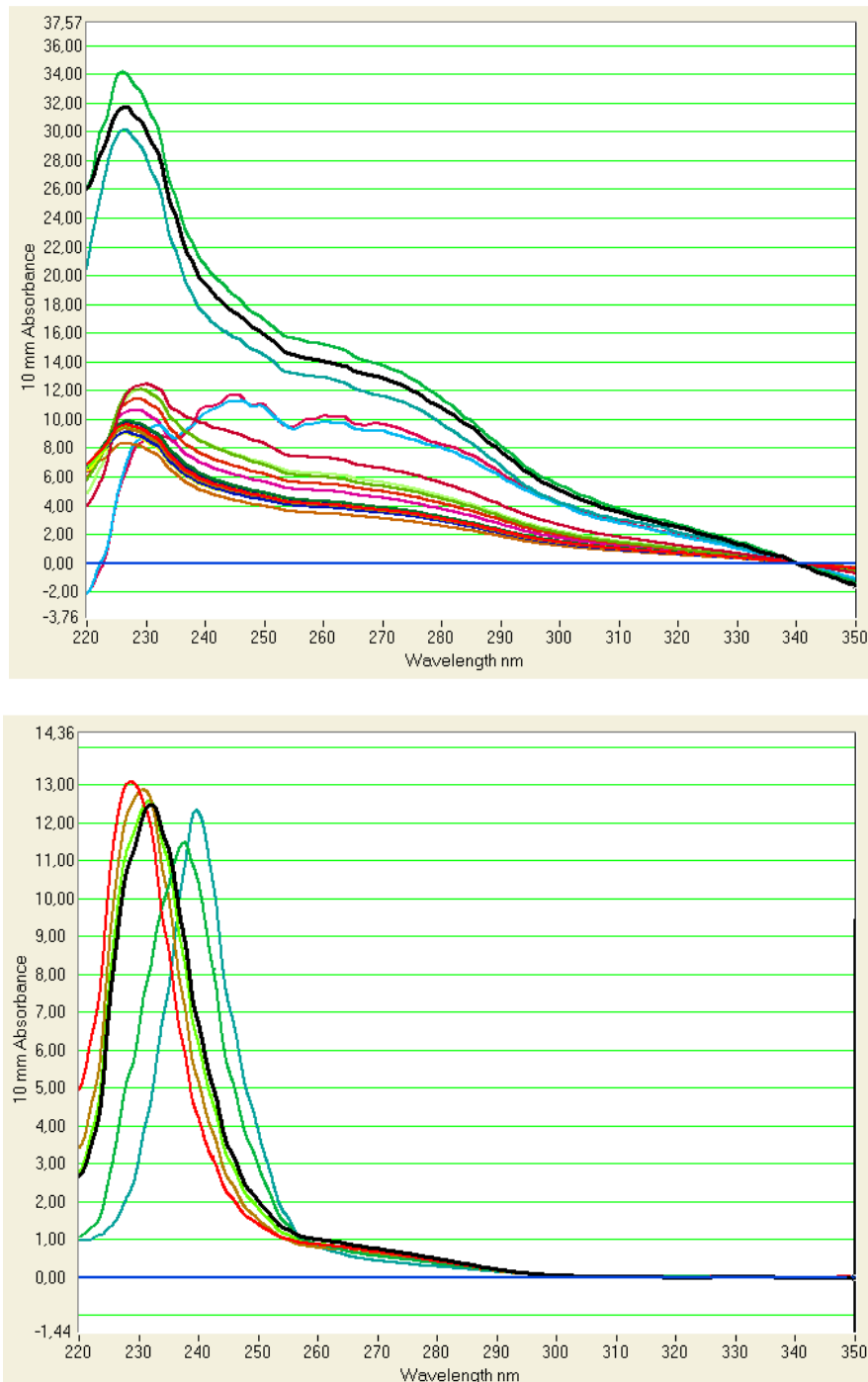


Abb. 4: Wirkung der DNA-Reinigung auf Präparationen von mit *M. anethi* befallenem Fruchtmehl (Ausgangsmenge für die Extraktion 0,1 g): Messung des Gehaltes mit UV-Spektrophotometer (Nano-Drop, Thermo Fisher) vor (oben) und nach (unten) der Reinigung mit GENE CLEAN® SPIN Kit (MP Biochemicals).

Für die Verbesserung der DNA-Qualität wurden verschiedene kommerzielle DNA-Reinigungskits vergleichend getestet. Mit Hilfe eines Kits der Fa. MP Biochemicals (GeneClean Spin Kit), der speziell für die Isolierung von DNA aus Bodenproben angeboten wird, gelang es schließlich, aus Reinkulturen von *M. anethi* sowie befallenen Fenchelfrüchten, reproduzierbar Pilz-DNA in guter Qualität und Menge zu gewinnen (Abb. 2 und 5, rechts).

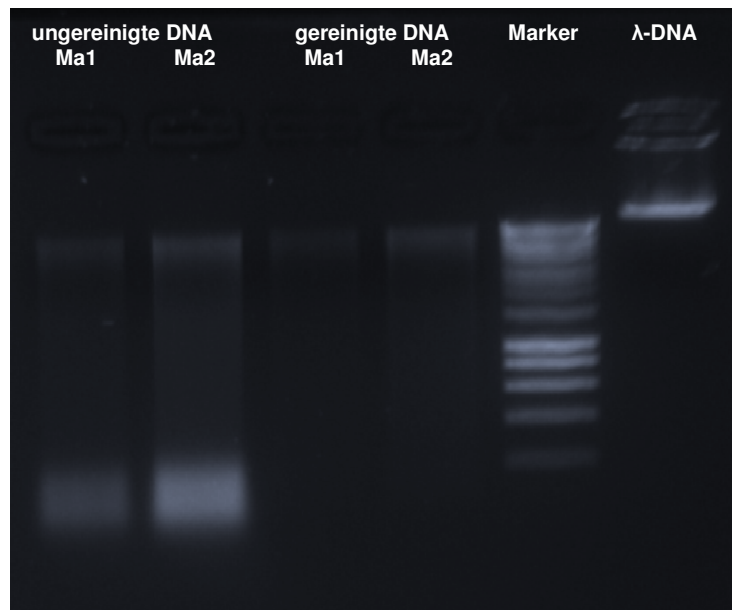


Abb. 5: Vergleich der Wirkung der DNA-Reinigung bei zwei DNA-Präparationen von *M. anethi*-Kulturen: (Ma 1 und 2) vor (links) und nach (rechts) der Reinigung der pilzlichen DNA mit GENE CLEAN® SPIN Kit (Firma MP Biomedicals) (Marker Hyperladder I™, bioline, 1,7 % TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid 0,1 µg/ ml).

1.1.1.1.2 Entwicklung hochspezifischer, selektiv amplifizierender Primer

1.1.1.1.2.1 Testung der etablierten Primer

a) Material und Methoden

Bei Projektbeginn wurde die DNA aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial des Pathosystems mittels des bewährten Kits (Puregene Yeast/ Bact. Kit B (Qiagen)) extrahiert und gereinigt (GENECLEAN® SPIN Kit (MP Biomedicals)).

Für die PCR-Reaktion wurden die etablierten Primerpaare (Punct F1: 5'-GCG TGT TTA TTG AAC GAT AGC-3'; R1: 5'-GGA AAG CGA CTA CGA AGA TG-3') eingesetzt, die sich in der Vergangenheit als sehr spezifisch für den Nachweis von *M. anethi* erwiesen hatten. Mit diesen Proben wurden die PCR-Reagenzien erprobt und optimal eingestellt. Zusätzlich sollte die DNA-Qualität und der Erfolg der PCR-Reaktion mittels pflanzenspezifischer Primerpaare überprüft werden. Dazu wurden Primerpaare aus dem Chloroplastengen der großen Untereinheit der Ribulose-bisphosphatcarboxylase (Accessions-Nr. D446567) (= Rubisco-Primer FoRu) abgeleitet (FoRu F1: 5'-TAG AGC GGT TTA TGA ATG TCT C -3'; FoRu R1: 5'-AAA GCC CAG AGT GAT GTC TC -3'). Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 30 µl und beinhaltete: 19,75 µl TdW, 3 µl 10 x Puffer mit MgCl₂, 1 µl 1 mM dNTPs, je 0,5 µl 20 µMol der spezifischen Primerpaare (z.B. Punct F1 und R1 bzw. FoRu F1 und R1), 0,25 µl 5U/ µl Taq-Polymerase sowie 5 µl DNA Zusatz.

Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 3 min bei 96 °C, dann 39 Zyklen bei 96 °C für 30 s; Annealing 30 s bei 55 °C; Polymerisation bei 72 °C für 1 min und bei der letzten Reaktion 72 °C für 10 min.

Die beiden Primerpaare (Punct und FoRu) sollten in einer Duplex-PCR gemeinsam eingesetzt werden, um die jeweiligen Proben sicher auf den Befall mit *M. anethi* testen zu können.

Im Weiteren sollten die Nachweisgrenzen der bereits vorhandenen spezifischen Primerpaare mit DNA aus unterschiedlichen Isolaten und Fenchelproben reevaluiert

und die PCR-Methodik für dieses Pathosystem fortlaufend optimiert werden. Dazu wurden aus künstlichen Mischungen in unterschiedlichen Gewichtsanteilen von Pilzmycel und Fenchelblättern DNA extrahiert und gereinigt. Mit diesen Proben wurde die PCR-Reaktion mittels Temperaturgradienten optimiert. Nachfolgend wurden Freilandproben aus befallenem Fruchtmehl und infizierten Blättern getestet. Für die PCR wurde ein Thermocycler von Sensoquest (Labcycler) und ein RT-Cycler von Eppendorf (Mastercycler @ep) verwendet.

b) Ergebnisse

Die PCR-Reaktion konnte mit den vorhandenen Reagenzien und DNA-Präparationen sehr gut durchgeführt werden. Die DNA-Gehaltsmessung (UV-Spektrophotometer NanoDrop) ergab zwar nur minimale Gehalte ($\leq 9 \text{ ng/}\mu\text{l}$) in den Proben aus Reinkulturen des Erregers, trotzdem war der Erregernachweis auf dem Gel eindeutig.

Bei Pflanzenproben und Mischproben aus Pflanze und Pilz war der DNA-Gehalt sehr unterschiedlich (86 - 277 $\text{ng/}\mu\text{l}$). Da es sich aber um Mischungen aus pflanzlicher und pilzlicher DNA handelte, war der Wert nicht aussagekräftig für den Erfolg eines Erregernachweises. Mit allen Proben musste daher eine zusätzliche oder Duplex-PCR (gleichzeitiger Nachweis von Pilz- und Fenchel-DNA in einer Reaktion) mit den Primerpaaren FoRu durchgeführt werden, um den grundsätzlichen Erfolg der Extraktion zu überprüfen. Erst nachfolgend konnte entschieden werden, ob eine Probe tatsächlich erregerefrei war.

Die PCR-Bedingungen konnten nicht wesentlich optimiert werden, sie wurden daher aus den bereits vorhandenen Protokollen übernommen (siehe Material und Methoden). Es wurden lediglich drei zusätzliche Zyklen angefügt. Die Verwendung einer Hotstart-Taq-Polymerase war nicht notwendig, wenn die Proben bis zum Beginn der Amplifikation auf Eis standen.

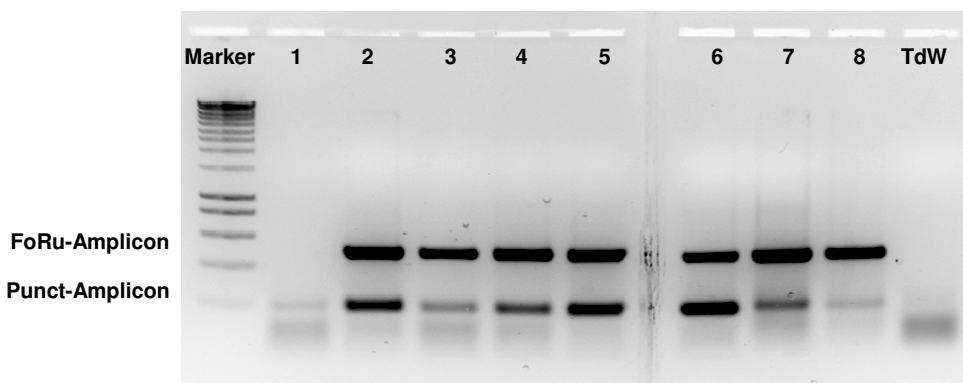


Abb. 6: Nachweis von *M. anethi*- und Fenchel-DNA mittels Duplex-PCR nach Extraktion aus einer Mischung von Pilzmycel und pilzfreiem Pflanzengewebe (für die Isolierungen wurden folgende Mengen eingesetzt: 1 = 0,002 g Pilz, 2 = 0,1g Pilz + 0,5 g Pflanze, 3 = 0,004 g Pilz + 0,05 g Pflanze, 4 = 0,02 g Pilz + 0,05 g Pflanze, 5 = 0,05 g Pilz + 0,05 g Pflanze, 6 = 0,08 g Pilz + 0,05 g Pflanze, 7 = 0,05 g Pilz + 0,050 g Pflanze, 8 = 0,003 g Pilz + 0,050 g Pflanze, TdW = Kontrolle) Gewichtsangabe bezieht sich auf eingewogenes Ausgangsmaterial für DNA-Extraktion. Es wurde die unverdünnte DNA verwendet (Marker Hyperladder I™, bioline, 1,7 % TAE-Agarosegel, mit Ethidiumbromid 0,1 $\mu\text{g/ ml}$).

Zunächst zeigten die spezifischen Primerpaare in der Duplex-PCR sehr gute Nachweisergebnisse. Die Pilz-Primerpaare Punct (Amplicon bei 0,3 kbp) und die Fenchel-Primerpaare FoRu (Amplicon bei 0,5 kbp) wiesen die jeweilige DNA bei künstlichen Mischungen von Mycel- und Pflanzenmaterial zuverlässig nach (Abb. 6), sodass der Fenchelprimer gleichzeitig dazu genutzt werden konnte, den Erfolg der DNA-Extrak-

tion zu überprüfen und so eine scheinbar negative Probe (ohne Pilznachweis) als unzureichende Extraktion zu identifizieren.

Nach erfolgreichen Untersuchungen von künstlichen Mischungen von Pilz- und Pflanzenmaterial wurde aus 120 Keimlingen (2 Sorten), aus stark infiziertem Saatgut in 6 unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Keimblatt-, 1. - 5. Laubblattstadium), aus Gewächshaus- und Freilandaussaat) DNA extrahiert und in der PCR getestet.

Trotz breiter Variation von Zellaufschlussmethoden der Pflanzenorgane (Blätter, Stiele) konnten aus diesem Material keine reproduzierbaren Befallsnachweise erzielt werden. Der gleichzeitige Nachweis von Pflanzen- und Pilz-DNA in einer Probe (Duplex-PCR) gelang nur in Einzelfällen. Die pflanzliche DNA war zwar immer nachzuweisen, die sehr geringen Mengen Pilz-DNA ergaben keine oder eine kaum sichtbare Bande auf dem Gel. Das Punct-Primerpaar amplifizierte immer einen Schmierfilm, der nur in Einzelfällen eine Bande erkennen ließ (vergleichbar Abb. 7). Der Pilznachweis blieb, wie auf dem oberen Gel erkennbar, trotz Variation der eingesetzten Probemenge für die Extraktion der DNA, unbefriedigend. Aus diesem Grund konnte eine zu geringe Menge des Erregermycels in der Probe nicht die Ursache sein.

Der sichtbare Schmierfilm konnte, neben Verunreinigungen der DNA, auch erst durch Fehlhybridisierungen während der PCR-Reaktion entstehen, falls das Primerpaar nicht ausreichend sensitiv reagierte (Mühlhardt 2009). Ein getrennter Nachweis (pilz- oder pflanzenspezifische Primer) in je einer einzelnen Reaktion (Abb. 7) lieferte ähnliche Ergebnisse.

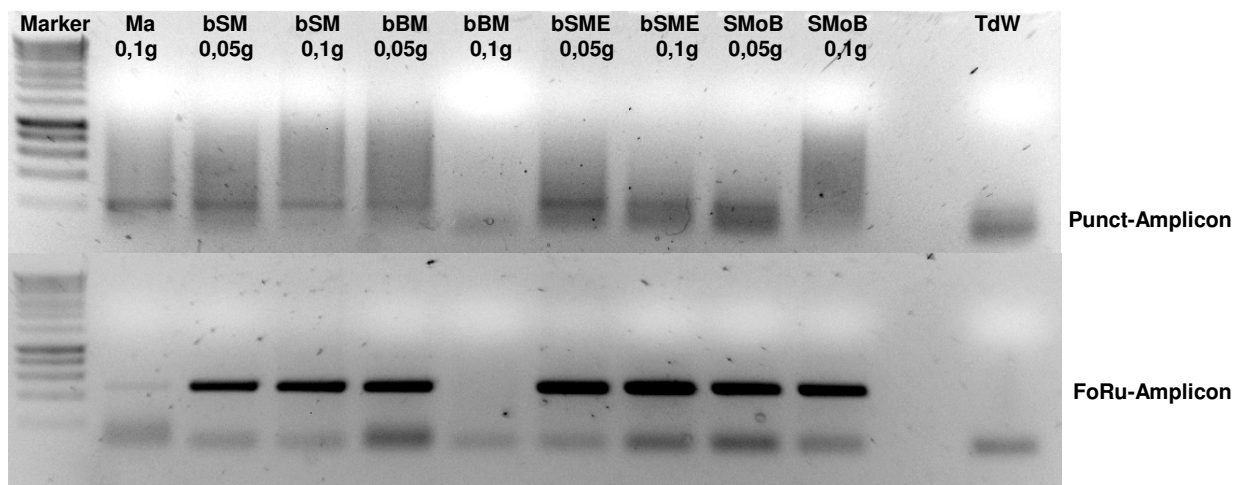


Abb. 7: Primertestung Punct- (oberes Gel) und FoRu-Primer (unteres Gel): Amplifikationsprodukte von *M. anethi* Kultur (Ma); zwei Proben befallener Früchte (bSM); zwei Proben befallener Blätter (bBM); zwei Proben befallener Früchte mit Endospermkernen (bSME); zwei Proben Früchte ohne sichtbaren Befall (SMoB). Gewichtsangabe bezieht sich auf eingewogenes Ausgangsmaterial für DNA-Extraktion. Es wurde die unverdünnte DNA verwendet (Marker Hyperladder ITM, bioline, 1,7 % TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid 0,1 µg/ml).

Erst bei Zusatz von zusätzlicher Pilz-DNA konnte ein positiver Nachweis erzielt werden. Dies deutete entweder doch auf eine viel zu niedrige Konzentration der pilzlichen DNA in der natürlich befallenen Mischprobe hin, bzw. auf eine zu geringe Spezifität des Punct-Primerpaars, bei dem es zu Fehlamplifikationen mit Fenchel-DNA kam.

Eine Nested-PCR (zwei aufeinanderfolgende PCR-Läufe, der 2. Lauf wird mit dem Produkt des ersten Laufs statt der Ausgangs-DNA durchgeführt) erhöht normalerweise bei anderen Erregern die Spezifität deutlich (McPherson et al. 1992, Jansohn et al. 2006, Mülhardt 2009), fehlamplifizierte Amplifikationsprodukte vom 1. PCR-Lauf werden von den neuen Produkten, des nun eingesetzten 2. Primerpaars (welches zwischen den vorherigen Primern liegt) überlagert.

Diese Methode erlaubt es normalerweise, auch geringste DNA-Gehalte von minderwertiger Qualität sicher nachzuweisen (Mülhardt 2009). In unserem Pathosystem brachten Nested-Primerpaare (Punct NF1: 5'-CGA CGA TAC CGA AGA AGA GC-3'; Punct NF2: 5'-AGG ACG AGG GCG AGT ATG -3'; Punct NR1: 5'-CCA TTG CCA TTA ACC TGG AC-3'; Punct NR2: 5'-GCC AAT CAA TGT TTC TGC C-3'; Kombinationen: Punct NF1 und Punct NR2; Punct NF1 und Punct NR1; Punct NF2 und Punct NR1) keine Verbesserung der Spezifität, der hartnäckige Schmierfilm durch Fehlhybridisierungen unterblieb nicht, der sichere, reproduzierbare Erregernachweis blieb aus.

1.1.1.1.2.2 Entwicklung neuer Primer

a) Material und Methoden

Da sich das zu Projektbeginn bereits vorhandene *M. anethi*-spezifische Primerpaar (Punct) im Laufe der Untersuchungen als wenig geeignet erwies, mussten zunächst weitere Genomsequenzen des Erregers (aus Gesamt-DNA) generiert werden. Hierfür wurden unter Verwendung isolierter Pilz-DNA und 20 randomisierter Dekamerprimer (RAPD OP A-Primer, Firma Roth) DNA-Fragmente amplifiziert. Die 20 OP A Primer wurden jeweils einzeln in einer Gradienten-PCR eingesetzt, um die optimale Annealingtemperatur für die PCR zu ermittelt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 30 µl und beinhaltete: 23,25 µl TdW, 3 µl 10 x Puffer mit MgCl₂, 1 µl 1 mM dNTPs, 0,5 µl 20 µMol des ausgewählten OP A Primers, 0,25 µl 5U/ µl Taq-Polymerase sowie 2 µl DNA-Zusatz. Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 3 min bei 96 °C, dann 42 Zyklen bei 96 °C für 30 s, Annealing 1 min (mittlere Temperatur des Gradienten 37,5 °C, Temperaturunterschied 12,5 °C), Polymerisation bei 72 °C für 2 min und bei der letzten Reaktion 72 °C für 10 min. 30 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen (Abb. 8).

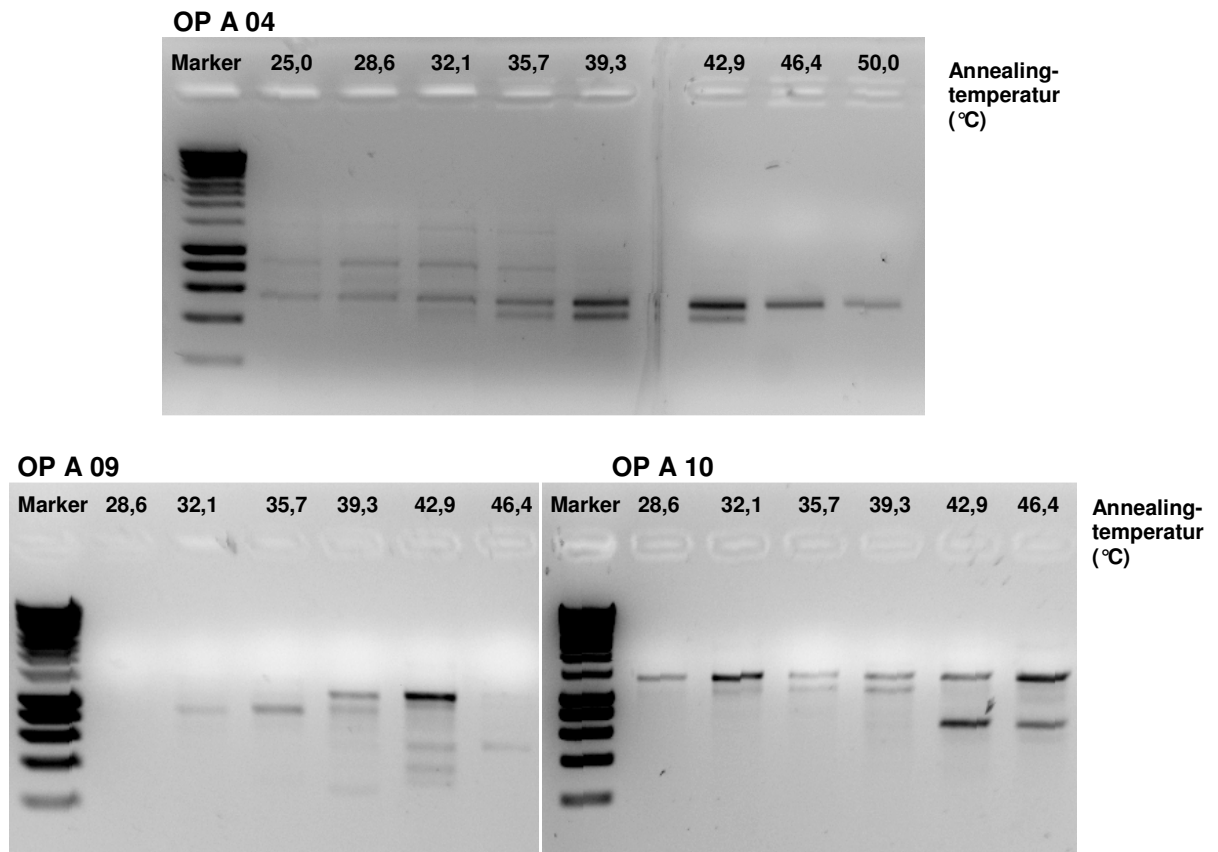


Abb. 8: Eignung von OP A-Primern (04, 09, 10) zur Amplifikation von *M. anethi*-Genomfragmenten mittels Temperaturgradienten. Ausgangsmaterial: Ma-DNA aus Mycel einer *in vitro* Kultur, (eingesetzt wurden jeweils 2 µl der unverdünnten DNA Präparate (Marker: Hyperladder ITM, bioline, 1,5 % TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid 0,1 µg/ml).

Elf PCR-Amplifikationsprodukte (OP A Primer 01, 04, 08, 09, 10) wurden, nach der Auftrennung, aus den Agarosegelen ausgeschnitten, extrahiert (DNA Extraction Kit, Millipore) und in den Vektor pSC-A-amp/kan nach Herstellerprotokoll (StrataClone, SoloPack, Stratagene) ligiert. Nach anschließender *E. coli*-Transformation wurden

die Klone mit Insert nach Standardmethoden selektiert und vermehrt. Die Plasmid-DNA-Präparation wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Vorschrift durchgeführt.

Eine Restriktionsanalyse mit Bam HI und EcoRV erlaubte die Selektion positiver Klone, deren DNA sequenziert wurde (Macrogen Inc. Korea). Aus den Sequenzdaten von 12 Klonen wurden 20 Primerpaare (Tab. 3) mit der Software NCBI BLAST abgeleitet und bestellt (BioTez Berlin-Buch GmbH). Zur Überprüfung der Eignung für den spezifischen und empfindlichen Nachweis von *M. anethi* wurde eine erste RT-PCR (Mastercycler®ep, eppendorf) durchgeführt.

Tab. 3: Übersicht über die neu generierten Primerpaare aus Amplifikationsprodukten von OP A-Primern zum Nachweis von *M. anethi*.

Name F1	Temperatur (°C)	Name R1	Temperatur (°C)	Produktlänge
T2a F1	60	T2a R1	60	304
T2b F1	60	T2b R1	56	432
T3a F1	62	T3a R1	60	377
T3b F1	60	T3b R1	60	376
T3c F1	60	T3c R1	62	532
T3d F1	60	T3d R1	58	373
T3e F1	60	T3e R1	60	304
T4a F1	56	T4a R1	58	344
T5a F1	58	T5a R1	62	336
T5b F1	62	T5b R1	58	419
T5c F1	60	T5c R1	58	415
T5d F1	62	T5d R1	60	400
T5e F1	60	T5e R1	60	398
T5f F1	60	T5f R1	62	395
T5g F1	60	T5g R1	60	397
T5h F1	60	T5h R1	62	394
T5i F1	60	T5i R1	60	396
T5j F1	60	T5j R1	62	393
T5k F1	60	T5k R1	58	394
T5l F1	60	T5l R1	60	393

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 20 µl und beinhaltete: 10,74 µl TdW, 2 µl 10 x Puffer, 0,66 µl 1 mM dNTPs, 2 µl 25 mM MgCl₂, je 0,4 µl 10 µM der jeweiligen Primerpaare (F1 und R1), 0,4 µl 10 µM TaqMan-Sonde SybrGreen, 0,4 µl Taq-Polymerase sowie 3 µl DNA Zusatz. Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 3 min bei 96 °C, dann 40 Zyklen bei 96 °C für 30 sek; Annealing 30 sek 58 °C, Polymerisation bei 72 °C für 1 min, nachfolgend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zur Überprüfung der Reaktion wurden 20 µl des PCR-Produkts aus der RT-PCR auf ein 1,5 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen

b) Ergebnisse

Nach der ersten Testung der 20 neuen Primerpaare erwiesen sich 7 (T4a, T5a, T5b, T5i, T5j, T5k, T5l) als sehr gut geeignet für den spezifischen Erregernachweis. Mit diesen Primern wurden weitere Testläufe (Gradienten-PCR) absolviert, um die

Reaktionsbedingungen der PCR zu optimieren. Nachfolgend konnten 2 Primerpaare (T4a und T5k) selektiert werden, die im Unterschied zur Ausgangssituation in der PCR auch mit 1:50 verdünnten DNA-Präparationen zu spezifischen Amplifikationsprodukten (Abb. 9) führten. Im Vergleich zu den bisherigen Punct-Primern ergab sich nicht der typische Schmierfilm bei Einsatz einer natürlich befallenen DNA-Mischprobe aus Fruchtmehl, sondern eine sehr deutliche Bande.

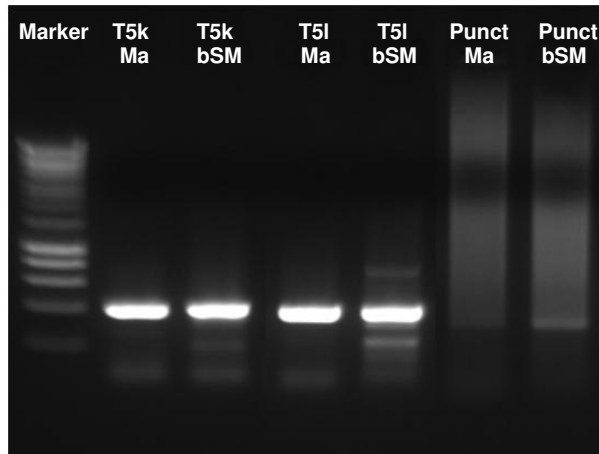


Abb. 9: Eignung von drei Primerpaaren zur spezifischen Amplifikation von *M. anethi* Genomfragmenten; T5k, T5l – neu generierte Primer, Punct- ursprünglich genutztes Primerpaar; Ausgangsmaterial: Ma-DNA aus *M. anethi*-Mycel (*in vitro* Kultur); bSM – DNA Präparat aus mit *M. anethi* befallenen Fenchelfrüchten (eingesetzt wurden jeweils 5 µl der unverdünnten DNA-Präparate). (Marker: Hyperladder ITM, bioline, 1,7 % TAE-Agarosegel mit Ethidiumbromid 0,1 µg/ml).

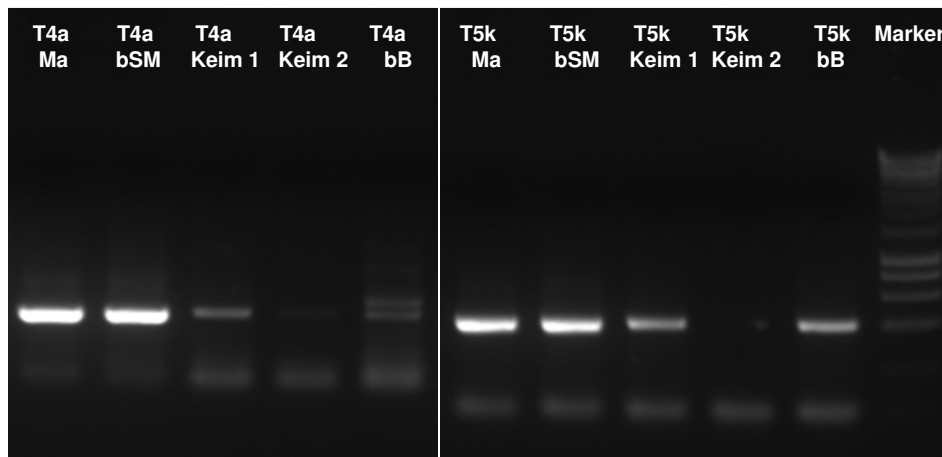


Abb. 10: Eignung von zwei Primerpaaren T4a (links) und T5k (rechts) zur spezifischen Amplifikation von DNA aus: *M. anethi*-Mycel (*in vitro* Kultur (Ma); mit *M. anethi* befallenen Fenchelfrüchten (bSM), Stielen von 2 Keimlingen (2 Wochen alt), angezogen aus infiziertem Saatgut (Keim1 und Keim1); mit *M. anethi* - befallener Blattprobe (bB) (eingesetzt wurden jeweils 5 µl der unverdünnten DNA-Präparate) (Marker: Hyperladder ITM, bioline, 1,7 % TAE-Agarosegel mit Ethidium-bromid 0,1 µg/ml).

Mit den neuen Primerpaaren konnte nicht nur die Sensitivität des Nachweises, sondern auch die Reproduzierbarkeit, d. h. die zukünftige Testsicherheit, deutlich erhöht werden. Erste Testungen waren sehr vielversprechend, mit Hilfe der neuen Primerpaare konnte das Erregermycel in Keimlingen, welche aus infiziertem Saatgut angezogen wurden, und in infizierten Früchten eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 10).

In einem weiteren Test wurden zwei *M. anethi*-Proben (DNA aus einer Kultur und eine Mischung aus Gewebekultur und Mycel) mit zwei Gesundkontrollen (Knollenfenchel und Gewebekulturpflanzen) verglichen (Abb. 11). Die eingesetzte Gesundkontrolle (DNA aus Gewebekulturpflanzen) war eindeutig befallsfrei.

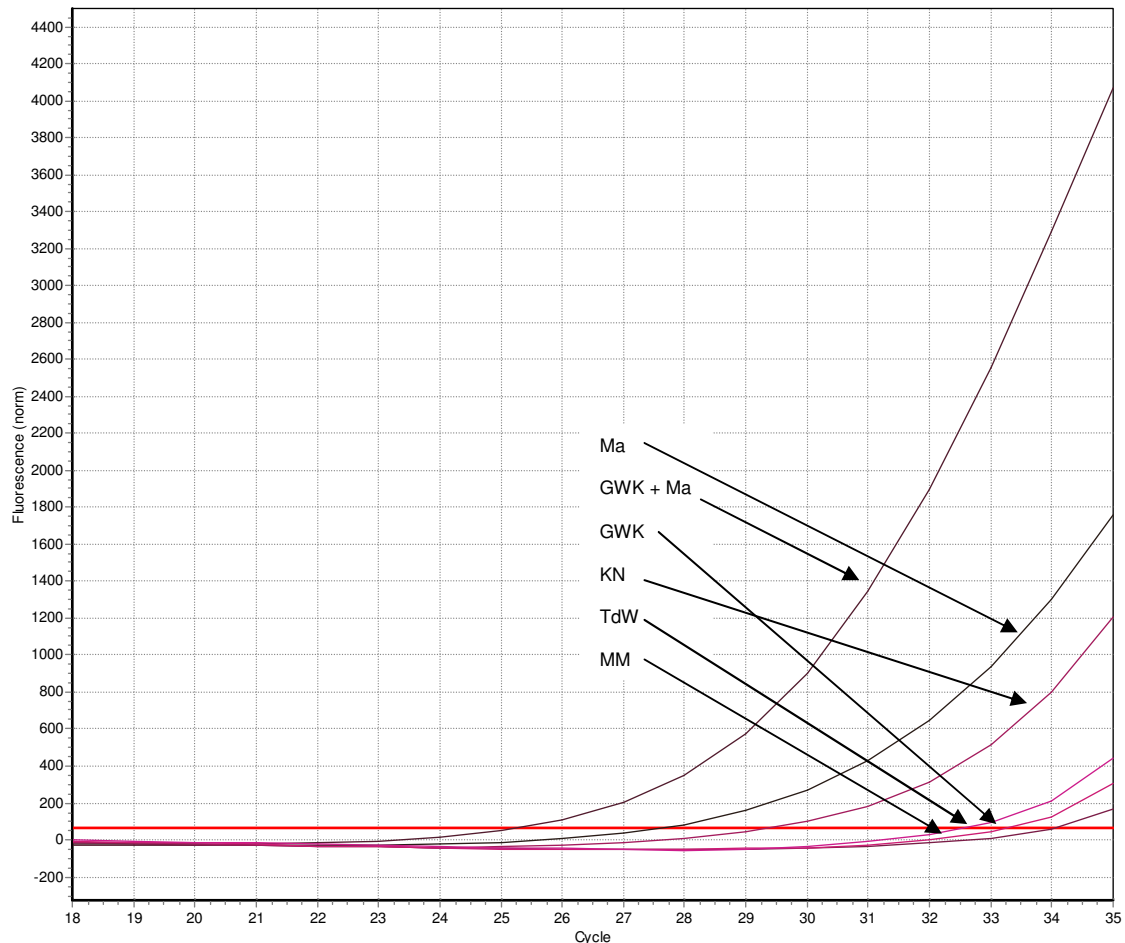


Abb. 11: Amplifikationskurven einer Real Time (RT)-PCR mit Primerpaar T4a. Eingesetzte DNA-Proben: *M. anethi*-Kultur (Ma); Mischung aus Fenchel aus Gewebekultur und *M. anethi*-Kultur (GWK + Ma); Fenchel aus Gewebekultur (GWK); Knollenfenchel (KN); Wasserkontrolle (TdW); Mastermixkontrolle (MM) (Mastercycler[®]ep, eppendorf)

Varianten

- M. anethi* - Kultur
- Fenchelgewebekultur + *M. anethi* - Kultur
- Fenchelgewebekultur
- Knollenfenchel
- Wasserkontrolle
- Mastermixkontrolle

Ct SYBR

- 27,72
- 25,31
- 34,13
- 29,51
- 33,41
- 32,69

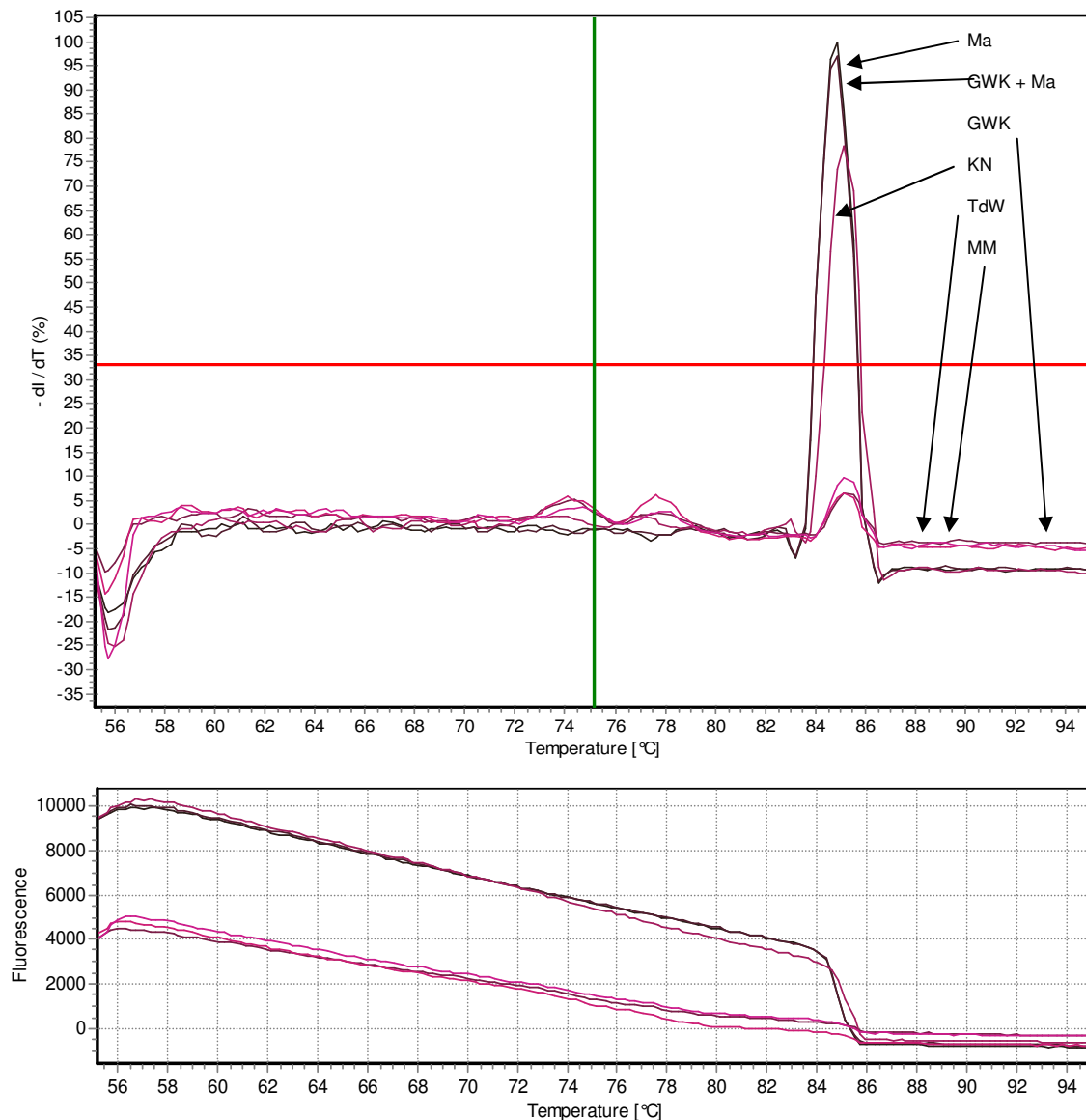


Abb. 12: Schmelzkurven der Real Time (RT)-PCR mit Primerpaar T4a (siehe Abb. 11). Eingesetzte DNA-Proben: *M. anethi*-Kultur (Ma); Mischung aus Fenchel aus Gewebekultur und *M. anethi*-Kultur (GWK + Ma); Fenchel aus Gewebekultur (GWK); Knollenfenchel (KN); Wasserkontrolle (TdW); Mastermixkontrolle (MM) (Mastercycler[®]ep, eppendorf).

1.1.1.2 Ausblick

Innerhalb der Projektlaufzeit konnten, aufgrund der erregertypischen Besonderheiten, leider nur die Grundlagen für die Entwicklung einer Real-Time PCR zum quantitativen genombasierten Pilznachweis geschaffen werden. Nach der Optimierung der Testparameter soll im Nachfolgeprojekt umgehend mit der Quantifizierung des Pilzbefalls in mehr als 100 DNA-Proben aus Pflanzen, Keimlingen und Früchten begonnen werden. Außerdem steht eine umfangreiche Sammlung von Fruchtchargen zur Verfügung, deren Pilzgehalt bereits mittels quantitativem PTA-ELISA bestimmt wurde. Von diesen Proben ist die gesamte Vorgeschichte ihrer Erzeugung dokumentiert worden. Neben Feldversuchsbonituren liegen auch Sichtboniturdaten vor. Daneben wurde eine Sammlung von Feldproben aus zahlreichen Praxisbeständen, sowie eines Fungizidversuchs angelegt. Aus diesen Chargen soll nachfolgend die DNA extrahiert und der Pilzbefall quantifiziert werden. Es wird

erwartet, dass sich aus der Befallsanalyse mittels qPCR zahlreiche neue Erkenntnisse ableiten lassen, die zur Verbesserung des Fenchelanbaus in Deutschland beitragen können.

1.1.1.3 Zitierte Literatur

ABD-ELSALAM, K., BAHKALI, A., MOSLEM, M., AMIN, O. E. und NIESSEN, L. (2011): An Optimized Protocol for DNA Extraction from Wheat Seeds and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) to Detect *Fusarium graminearum* Contamination of Wheat Grain. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 3459-3472

BELL, A. A., STIPANOVIC, R. D., PUHALLA, J. E. (1976): Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*: Identification of (+)-scytalone as a natural precursor to melanin. *Tetrahedron* 32: 1353-6.

CHEN, W. CUI, H., BAO, J., ZHOU, X. und SHU, Q. (2006): A Simplified Rice DNA Extraction Protocol for PCR Analysis, *Rice Science* 13 (1), 67-70

CHEN, Q., WIE, S., DENG, Z., YIN L., HE, B., KONG, X. (2009): Optimization of DNA Extraction from Seeds of *Sorghum sudanense* (Piper) Stapf.. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37, (1), 256-260

CHOI, Y.-E. und Goodwin, S. B. (2011a): *MVE1*, Encoding the Velvet Gene Product Homolog in *Mycosphaerella graminicola*, Is Associated with Aerial Mycelium Formation, Melanin Biosynthesis, Hyphal Swelling, and Light Signaling. *Appl Environ Microbiol.* 77, (3), 942–953

CHOI, Y.-E. und Goodwin, S. B. (2011b): Gene Encoding a c-Type Cyclin in *Mycosphaerella graminicola* Is Involved in Aerial Mycelium Formation, Filamentous Growth, Hyphal Swelling, Melanin Biosynthesis, Stress Response, and Pathogenicity *MPMI* Vol. 24, No. 4, pp. 469–477.

SHAHZADI, I., AHMED, R., HASSAN, A. und SHAH, M. M. (2010): Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genet. Mol. Res.* 9, (1), 386-393

ECKHART, L., BACH, J., BAN, J. und TSCHACHLER E. (2000): Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 19, 271, (3), 726-30

GREENBLATT, G.A. und WHEELER, M. H. (1986): HPLC analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites. *J Liq Chromatog* 9: 971-81

HOPPE, B. (2005): Studie zum Stand des Anbaus von Arznei- und Gewürzpflanzen in Deutschland (2003) und Abschätzung der Entwicklungstrend in den Folgejahren. Abschlussbericht veröffentlicht in Kurzfassungen der Vorträge des 16. Bernburger Winterseminars

ISLAS-FLORES, I., PERAZA-ECHEVERRÍA, L., CANTO-CANCHÉ, B. und RODRÍGUEZ-GARCÍA, C. (2006): Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*, 3, 45 50

JANSOHN, M., AIGNER, A., BANGSOW, T., CZUBAYKO, F. und DECHERT, U. (2006): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage

JHINGAN, J. L. (1992) . A novel technology for DNA isolation. *Methods in Mol. and Cel. Biol.* 3,15-22

KAWAMURA, C., MORIWAKI, J., KIMURA, N., FUJITA, Y., FUJI, S., HIRANO, T., KOIZUMI, S. und TSUGE, T. (1997): The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol PI Microbe Interactions* 10, (4), 446-53

KRIŽMAN, M., JAKŠE, J., BARIČEVIČ, D., JAVORNIK, B. und PROŠEK, M. (2006): Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta agriculturae Slovenica*, 87 - 2, september 2006 str. 427 - 433

KUMAR MISHRA, M., SANDHYA R. N., RAM, A. S., SREENATH, H. L. und JAYARAMA (2008): A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7, (4), 409-413

McPherson, M. J. (Editor), Quirke , P. (Editor) und Taylor, G. R. (Editor) (1992): PCR: A Practical Approach (Practical Approach Series) Paperback; Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo

MÜLHARDT, C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage

PANK, F., QUILITZSCH, R. und KRÜGER, H. (2007): Entwicklung und Charakterisierung von Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) mit verminderter *Mycosphaerella*-Anfälligkeit. *Arzn. Gew. Pfl.* 4, 166-174

SHAHZADI, I., AHMED, R., HASSAN, A. und SHAH, M. M. (2010): Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genet. Mol. Res.* 9, (1), 386-393

TAUBENRAUCH, K. (2007): Mykologische und epidemiologische Untersuchungen des Pathosystems *Mycosphaerella anethi* - Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Dissertation Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (http://www.tib.uni-hannover.de/spezialsammlungen/dissertationen/hannover/uebersichten/GGTSPU-styx.bba.de-31744-2017701-DAT/diss_07.pdf)

TOKOUSBALIDES, M.C. und SISLER, H.D. (1979): Site of inhibition by Tricyclazole in the melanin biosynthetic pathway of *Verticillium dahliae*. *Pesticide Biochem Physiol* 11, 64-73

VIVIANI, F., VIDAL-CROS, A. und GANDRY, M. (1993): Biosynthesis of melanin by *Pyricularia oryzae*. Inhibition by systemic fungicides. In: Fritig B, Legrand M (eds) *Mechanisms of Plant Defense Response*, Kluwer Academic Publ: Dordrecht, pp. 461

von POST, R., von POST, L., DAYTEG, C., NILSSON, M., FORSTER, B. P. und TUVESSEON, S. (2003): A high-throughput DNA extraction method for barley seed. *Euphytica* 130, 255–260

WHEELER, M. H. (1983): Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans Br Mycol Soc* 81, 29-36

WHEELER, M. H. und STIPANOVIC, R.D. (1985): Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitis*. *Archs Microbiol* 142, 234-41

1.1.2 Optimierter semi-quantitativer PTA-ELISA für Fenchel Früchte

1.1.2.1 Einleitung

Zum serologischen Nachweis des Erregers wurde bereits im Jahr 2000 ein PTA-ELISA und ein DTBIA (direct tissue blot immuno assay) mit JKI-eigenen polyklonalen Antisera etabliert (Taubenrauch 2007). Mit Hilfe dieses serologischen Tests konnte das latent wachsende Mycel innerhalb des Blattgewebes sowie die gebildete Konidienmenge erfasst werden. Auf diese Weise konnten Anfälligkeitsunterschiede zwischen den Sorten und das Vermehrungspotenzial des Pilzes ermittelt werden, da der Hauptanteil des Befallswertes auf die Bildung von Konidienlagern zurückzuführen war. Zum Nachweis des Befalls an Früchten wurden bereits erste grundlegende Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der aussichtsreichen Ergebnisse wurde der Testablauf für größere Probenmengen optimiert.

Im jetzt abgeschlossenen Projekt hatte sich gezeigt, dass der PTA-ELISA nicht zum Nachweis von latent infiziertem Pflanzengewebe geeignet war, da dort nur minimale Mycelmengen gebildet werden. Bei serologischen Tests werden üblicherweise Pflanzensäfte geprüft, die durch das Pressen von Pflanzenteilen entstehen. Da bei *M. anethi* das feine Mycel im latenten Stadium zwischen den Zellen wächst (siehe mykologische Untersuchung), war es im Pflanzensaft kaum existent. Erst beim Erscheinen der Symptome auf der Blattepidermis war ein ELISA-Test erfolgreich.

Da sich bei der molekularbiologischen Erregerquantifizierung einige wesentliche Probleme ergeben hatten, sollte der serologische Test eine alternative Lösung eröffnen. Der Test sollte für die Praxis eine schnelle und praktikable Möglichkeit bieten, Fruchtchargen prüfen zu lassen. Gleichzeitig sollte er zukünftig zur Datenabsicherung der Ergebnisse des molekularbiologischen Tests beitragen

Für die Befallsquantifizierung des Erregers an den reifen Früchten, an denen die Symptome deutlich zu erkennen waren, wurde dieser etablierte serologische Test daher optimiert und auf die Besonderheiten des Fruchtmehls abgestimmt, welches sehr stark quellfähig war und zahlreiche aromatische und fette Öle beinhaltete. Die Arbeiten zur Fruchtaufbereitung und Probenahme waren natürlich auch für die molekularbiologische Testentwicklung notwendig und übertragbar.

Außer am JKI wurden weltweit noch keine anderen serologischen Nachweismethoden für *M. anethi* entwickelt und veröffentlicht.

1.1.2.2 Material und Methoden

Zunächst mussten Methoden der Fruchtaufbereitung entwickelt werden, die einen serologischen Test des Fruchtmehls überhaupt erst ermöglichten. Wesentlich war bei diesem Pathosystem die Feststellung einer repräsentativen Fruchtcharge. Da bei Fenchel jede Pflanze, Dolde und Frucht unterschiedlich stark befallen war, musste ermittelt werden, welche Anzahl von Früchten zur Erfassung des Befalls einer großen Charge (mehrere Kilos bis Dezitonnen) geeignet war.

Daneben sollte ein Testablauf entwickelt werden, bei dem der Fruchtbefall quantitativ ermittelt werden konnte. Dieser Test sollte robust, praktikabel und sicher sein, sowie einen Feinnachweis des Erregers ermöglichen.

Von den Projektpartnern wurden zahlreiche Fenchel fruchtproben mit unterschiedlichem Ausgangsbefall zur Verfügung gestellt. Diese Proben, sowie das Erntegut einiger Feldversuche, wurden für die Testeinstellung verwendet.

1.1.2.3 Ergebnisse

1.1.2.3.1 Feststellung einer repräsentativen Fruchtcharge

Ein serologischer Test war durchaus in der Lage auch äußerst geringe Mycelmengen nachzuweisen. Wesentlich war jedoch, dass die Größe des einzusetzenden Probevolumens beschränkt war. Sowohl beim ELISA als auch bei der PCR ließen sich maximal 1-2 g Fruchtmehl einsetzen, weil es sehr stark aufquoll. Die eingesetzten Puffer wurden vollständig absorbiert, was den weiteren Test unmöglich machte. Da das Volumen der Tubes nur maximal 2 ml betrug, konnte die Flüssigkeitsmenge nur unwesentlich erhöht werden.

Da bei Fenchel sogar jede Frucht unterschiedlich stark infiziert war, wurde zunächst eine exakte Sichtbonitur von Einzelfrüchten durchgeführt (Abb. 13). Es musste ein Gewebe mit relevanten Befallsunterschieden ausgewählt werden, von dem eine Mischprobe von zahlreichen Früchten hergestellt werden konnte. Ein exemplarischer Gesundheitsnachweis für Einzelfrüchte war nicht sinnvoll, d. h. nicht aussagekräftig für eine Fruchtcharge.



Abb. 13: Befallene Fenchel Früchte: kaum erkennbarer Befall mit *M. anethi* (links); starker Befall (mitte) und Nahansicht einer ehemaligen Narbe mit Konidienlagern.

Bei der Nahansicht stellte sich heraus, dass lediglich die Fruchthülle stark befallen war, die Endospermkerne (siehe mykologische Untersuchung) waren gar nicht oder nur unwesentlich infiziert. Der Hauptanteil des Pilzes befand sich auf der Außenhülle der Früchte, überwiegend sehr unregelmäßig verteilt (Abb. 14).

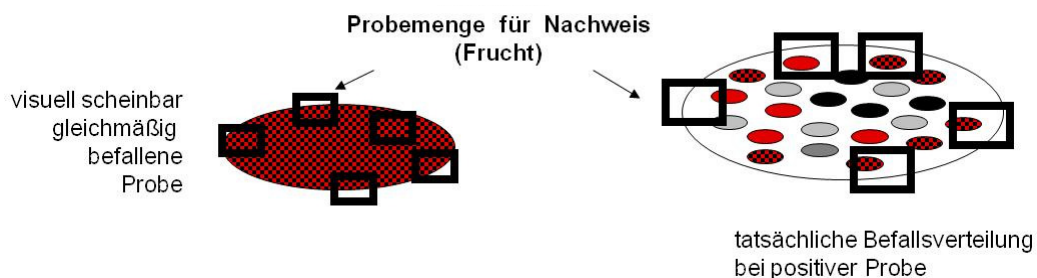


Abb.14: Schema des Fruchtbefalls einer einzelnen befallenen Fenchel frucht: Nach Sichtbonitur erschien eine Frucht zunächst gleichmäßig befallen, daher wäre der Ort der Probenahme nicht entscheidend (links). Nach Analyse der Feinsymptome (rechts) wurde deutlich, dass es zahlreiche unterschiedliche Befallsherde gab, daneben auch unbefallene Abschnitte. Daher beeinflusste der Ort der Probenahme sehr stark das Ergebnis des Tests.

Aus diesem Grund musste das Probevolumen (Anzahl der Früchte) wesentlich erhöht werden, die Endospermkerne waren für die Kontaminationshöhe einer Charge nicht entscheidend. Es wurde daher das Fruchtmehl der äußeren Hülle ohne Endospermkerne zur Befallsquantifizierung eingesetzt. Pro Charge wurden aus der

Vorprobe je 16 Tubes (2 ml) zu 3/4 mit ganzen gereinigten Früchten gefüllt. Nach Zugabe von zwei Stahlkugeln (\varnothing 3 mm) entstand in der Schwingkugelmühle (MM 300, Retsch) aus der Fruchthülle feines Mehl. Von dieser Probe wurden je 0,1 g für den ELISA abgewogen.

1.1.2.3.2 Fruchtprobenaufbereitung

Die Probenaufbereitung für den serologischen Nachweis gestaltet sich bei Fenchel schwierig, da die Früchte aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen: einer strohigen Außenhülle und einem gummiartigen festen Endospermkern. Zur Zerkleinerung wurden unterschiedliche Methoden erprobt (Mörsern mit und ohne Stickstoff (N_2), Kugelmühlen mit Variation der Kugelmenge und -größe, Spezialmühlen mit vorgeschalteter N_2 -Kühlung etc.).

Als geeignetste Variante erwies sich der Einsatz einer Schwingkugelmühle (MM 300, Retsch) mit zwei Nirostahlkugeln (\varnothing 3 mm). Die befallene Fruchthülle wurde vom Endospermkern fein abgeschält und zermahlen (Partikelgröße $< 5 \mu m$). Durch Absiebung der Endospermkerne, an denen die Pilzkontamination minimal war, konnte eine höhere Anzahl von Früchten in den Test einbezogen und die enthaltene Pilzmycelmenge konzentriert werden. Nach den ersten serologischen Vortestungen mit Fenchelfruchtmehl ergab sich ein weiteres Problem. Fenchelfrüchte enthalten zahlreiche aromatische und ölhaltige Inhaltsstoffe in der äußeren Fruchthülle sowie viele Proteine im Endospermgewebe. Alle diese Stoffe können den Erregernachweis erschweren. Bei Beschädigung der äußeren Fruchthülle, in der die Ölgänge lokalisiert sind, treten die Öle (Fenchane wie Fenchon und Fenchol) aus und benetzen die Oberflächen des Labormaterials (z. B. die Wells der ELISA-Platten).

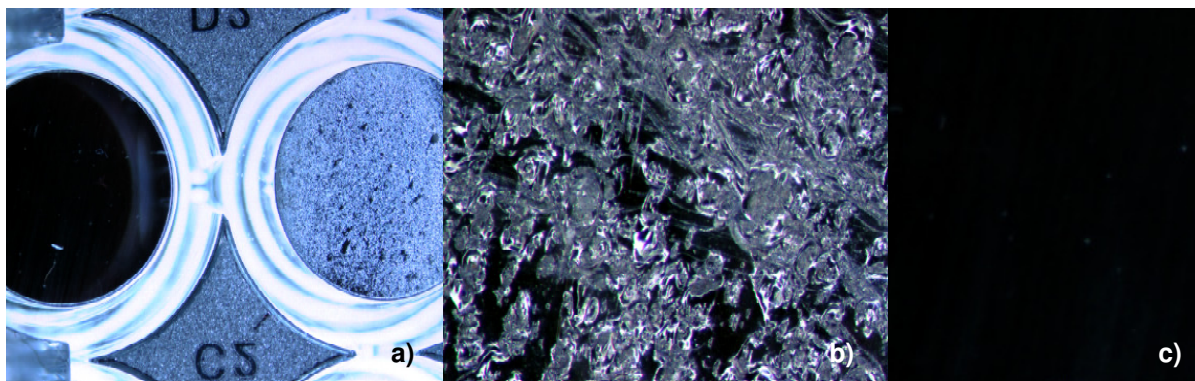


Abb. 15: Wirkung von Fenchelöl auf Hartplastik; **a)** Ansicht von zwei leeren Wells einer Mikrotiterplatte nach der ELISA-Testung: Puffervariante (links) bleibt klar und Fruchtprobe (rechts) verätzt die Oberfläche und verursacht dadurch eine starke Trübung; **b)** Nahansicht der Polystyrol-Oberfläche eines Wells nach der Testung der Fruchtprobe; **c)** Nahansicht der PP-Oberfläche eines Wells nach der Testung der Pufferprobe.

Diese Fruchtöle (vermutlich überwiegend Terpene) verursachten bei Mikrotiterplatten aus Polystyrol eine so starke Oberflächentrübung (Abb. 15), dass Werte der photometrischen Messung verfälscht wurden. Die Menge dieser Inhaltsstoffe variierte je nach Fenchelsorte bzw. -akzession. Der angestrebte Vergleich von Fruchtchargen war deshalb nur durch vorherige Elimination dieser Inhaltsstoffe möglich. Lösungsmittel sowie Zusätze anderer, weniger aggressiver Pflanzenöle erwiesen sich als ungeeignet. Mittels eines Wasserbads (60 min bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ bei offenen Probengefäßen) konnten die Terpene verdampft werden (Abb. 17); erst anschließend war die serologische Testung durchführbar.

Für die Entwicklung einer Methode zum quantitativen serologischen Nachweis des Pilzes an Früchten waren zahlreiche Voruntersuchungen erforderlich. Zunächst wurde der Versuchsablauf durch Testung von Antiservenverdünnungen, Pufferkonzentrationen und Substratinkubationszeiten optimiert. Für den Antigennachweis in Früchten wurden die Konzentrationen der IgG-Präparation, der Puffervarianten und der Probenaufbereitung optimiert.

Dann folgte die Ermittlung des geeigneten Verhältnisses von Fruchtmehl und Puffer sowie der Standzeit, wobei die starke Quellung des Fruchtmehls berücksichtigt werden musste. Es erwies sich als zwingend notwendig, die Proben nach dem Quellen durch Gaze zu filtrieren, um eine homogene Abschwemmungslösung zu erhalten.

Nach Testung von acht Puffermischungen in unterschiedlichen Konzentrationen erwies sich eine Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)-Mischung (10 ml PBS + 200 µl EDTA) als besonders geeignet zur Probenaufbereitung.

1.1.2.3.3 Testablauf des semi-quantitativen PTA-ELISA

Probenahme und -aufbereitung

Pro Charge wurden je 0,1 g Fruchtmehl aus einer größeren Vorprobe abgewogen (Abb. 16). Als Negativkontrolle wurde, da keine Gesundkontrolle in diesem Pathosystem existierte, eine „Berfena“-Charge ausgewählt, die nach eingehender Sichtbonitur nur äußerst vereinzelte Konidienlager auf Früchten oder Stielresten aufwies.

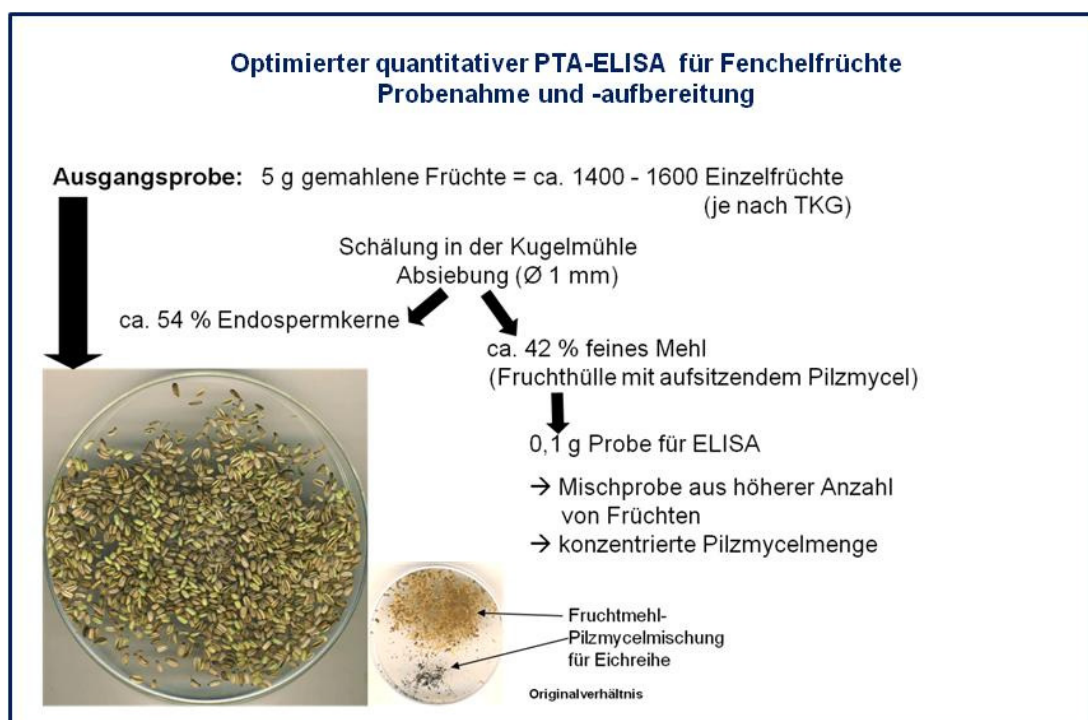


Abb. 16: Schema der Probenaufbereitung von Fenchelfrüchten für den PTA-ELISA.

Als Positivkontrolle wurde getrocknetes gemörsertes *M. anethi*-Mycel (Abb. 16) aus einer Sterilkultur ausgewählt. Neben den Prüfgliedern wurden immer zwei Fruchtchargen („Berfena“) als Standardproben mitgeführt, eine wenig und eine stark befallene Charge, die zur Überprüfung und Einordnung der Testreaktion dienten.

Zur Ermittlung der Pilzkontamination der Fruchtchargen wurde jeweils eine Eichreihe mit 10 Verdünnungsschritten aus einer Mischung von unbefallenem Fruchtmehl und einer *M. anethi*-Reinkultur bei jeder Mikrotiterplatte mit aufgetragen (Abb. 17). Anhand dieser Parameter sollte eine gleichbleibende überprüfbare Qualität der Testung gewährleistet werden.



Abb. 17: Ausgangsprobe (links), Tubes im Wasserbad zur Verdampfung der Terpene (Mitte), aufgetragene Doppelproben auf ELISA-Platte (rechts).

Anschließend wurde der PTA-ELISA mit den üblichen Arbeitsschritten durchgeführt:

- **IgG-Coating: Auftragen des extrahierten Probenmaterials:**
- 2 x 100 µl des extrahierten Probenmaterials, der Standards, der Verdünnungsreihe und des reinen PBS/EDTA-Puffers (Blank) werden in die jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte (NUNC PolySorb) als Doppelproben pipettiert
- Platte abgedeckt über Nacht bei 4 °C zum Coating des Antigens in den Kühlschrank stellen, morgens Platten ausgießen ohne zu waschen
- **Blocking** mit PBS + 1% Magermilchpulver (*Trockenmilch - 1g Fett/ 100g Pulver*) (*Ansatzmenge für 1 Platte 20 ml PBS + 0,2 g Trockenmilch 200 µl*) Inkubation für ca. 30 min in feuchter Kammer bei 37 °C
- **Waschen** im Washer mit PBS + Tween
- **Inkubation mit IgG** (48/6 *M. anethi*-Mycel) 1 µg/ml (*Ansatzmenge für 1 Platte 10 ml PBS + 200 µl der 1:50 IgG Verdünnung + 0,1g Trockenmilch*); Auftragemenge 100 µl/Well; Inkubation in feuchter Kammer für 2 h bei 37 °C
- **Waschen** im Washer mit PBS + Tween
- **Inkubation mit Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ZAKAK)** (*ZAKAK 1:2000 entspricht einer Konzentration von 0,3 mg Antikörper/ml, da das gefriergetrocknete Pulver in 1,0 ml TdW gelöst wurde (entspr. 0,6 mg/ml); anschließend zur besseren Lagerung nochmals 1,0 ml Glycerin hinzugefügt, d. h. es verringert sich die Konzentration von 0,6 mg/ml auf 0,3 mg/ml. Letztendlich befinden sich im Well bei 100 µl insgesamt 30 ng Antikörper*) in 0,005 M Tris-HCl pH 8,0 + 1% Magermilch (*1 ml 0,05M Tris-HCl+ 9 ml TdW + 0,1 g Trockenmilch je Platte + 5 µl ZAKAK (1:2000)*) Auftragemenge 100 µl, Inkubation in feuchter Kammer bei 37 °C für 1,5 h
- **Waschen** im Washer mit PBS + Tween

- **Substratreaktion** p-Nitrophenylphosphat (1 mg/ml) in Diethanolaminpuffer pH 9,8 lösen, Auftragemenge 200 µl, anschließend 1 h bei Raumtemperatur dunkel inkubieren und danach am Fotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm messen
- **Verrechnung der Feindaten** (*Nettoextinktion der Probe*)

1.1.2.3.4 Verrechnungsschema für die Messwerte

Zunächst wurden die ELISA-Eichkurvenwerte als logarithmische Funktion dargestellt und die zugehörigen Trendlinien ermittelt (Abb. 18). Anhand der Formel der Trendlinien, die nach x aufgelöst wurden, wurden die Mycelkonzentrationen in den Proben errechnet (*M. anethi*-Gehalt in ng/g Fruchtmehl).

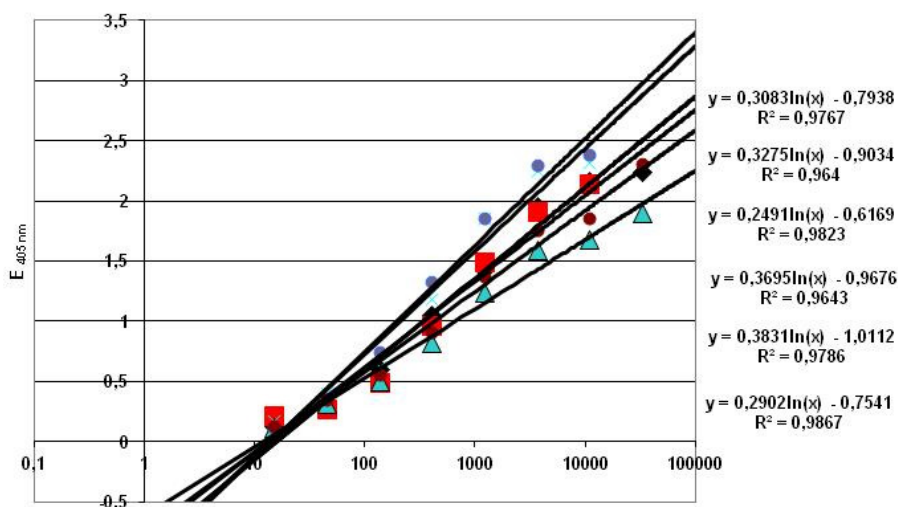


Abb. 18: Trendlinienvergleich von 2 ELISA-Testungen (bestehend aus je 3 Platten).

Durch die logarithmische Darstellung der Trendlinien ergaben sich, besonders für die höheren Konzentrationen des Mycels, automatisch größere Wertunterschiede durch die unterschiedlichen Steigungen, d. h. die Spannbreite der Werte wurde größer (Abb. 19). Vergleiche der ermittelten Extinktionswerte und Mycelgehalte anhand der Trendlinien von unterschiedlichen Testterminen ergaben eine sehr gute Übereinstimmung und signifikante Wertekorrelationen (Abb. 19 - 21). Zwischen wiederholten Fruchtchargetests auf unterschiedlichen Platten ergaben sich ebenfalls jeweils signifikante Korrelationen zwischen den Tests. Um die einzelnen Tests und alle getesteten Proben konkret miteinander vergleichen zu können, wurde zusätzlich der prozentuale Befall der Proben im Vergleich zum Standard (= stärkste befallene Probe = 100 %) ermittelt (Abb. 21), was durch die Mitführung der Standards auf jeder Platte möglich war.

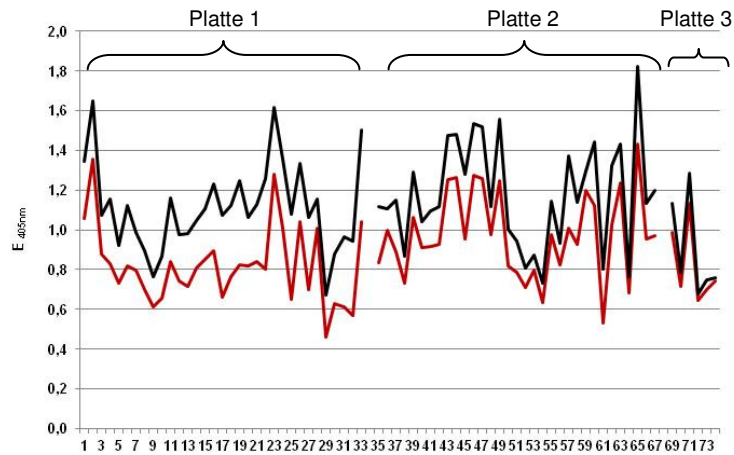


Abb. 19: ELISA-Extinktionswerte von 2 Testungen einer Charge (75 Proben), verteilt auf je 3 ELISA-Platten. Zwischen den Testungen war die Korrelation signifikant ($r = 0,910$).

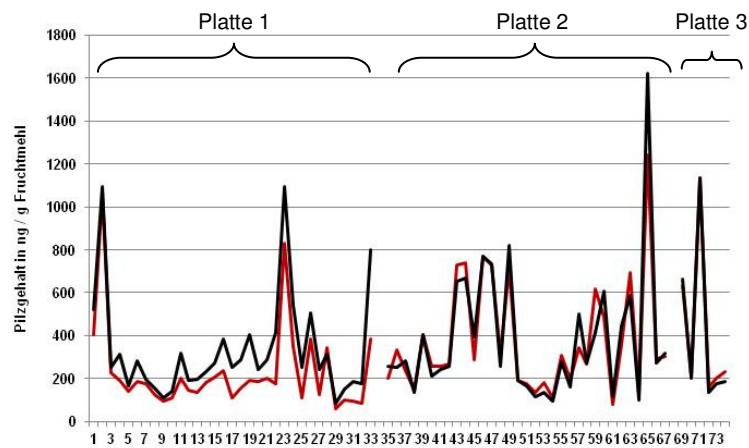


Abb. 20: Ermittelter *M. anethi*-Myzelgehalt in ng/g Fruchtmehl von 2 Testungen einer Charge (75 Proben), verteilt auf je 3 ELISA-Platten. Zwischen den Testungen war die Korrelation signifikant ($r = 0,912$).

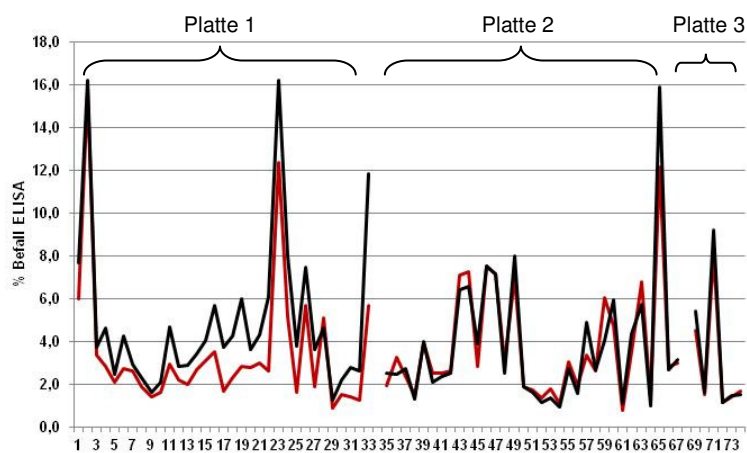


Abb. 21: Prozentualer Befall (im Vergleich zur am stärksten befallenen Variante) von 2 Testungen einer Charge (75 Proben), verteilt auf je 3 ELISA-Platten. Zwischen den Testungen war die Korrelation signifikant ($r = 0,920$).

1.1.2.3.5 Überprüfung der Genauigkeit der PTA-ELISA-Werte Übereinstimmung von Sichtbonitur und serologisch ermittelten Befallswerten

Zur Überprüfung der serologisch ermittelten Befallswerte wurden Fruchthargen zusätzlich durch Sichtbonitur nach ihrem Befallsgrad auf der Fruchtoberfläche klassifiziert. Nach der Aussaat und Ernte der Einzelparzellen im Jahr 2009 (Standort QLB) waren die beiden Bonituren (ELISA und Sichtbonitur) jeweils signifikant korreliert ($r = 0,811$ bzw. $0,755$) (Abb. 22 und 23).

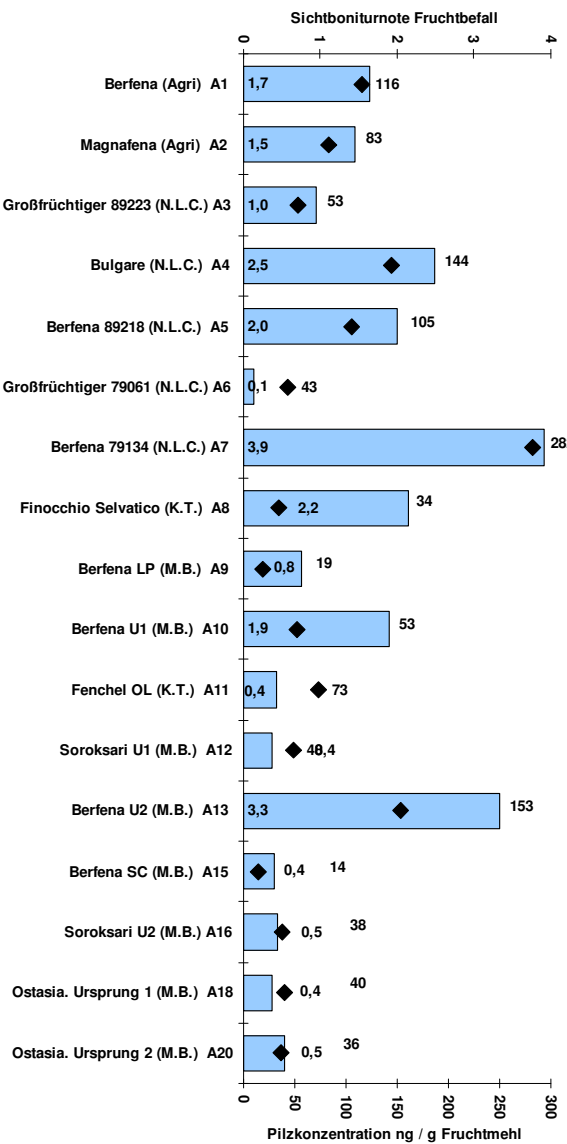


Abb. 22: Vergleich von Sichtbonitur der Früchte des Ausgangssaatgutes 2009 (Boniturnote = Säule und Wert unten) und umgerechneter ELISA-Wert (Pilzkontamination ng/g Samenmehl = Raute und Wert oben).

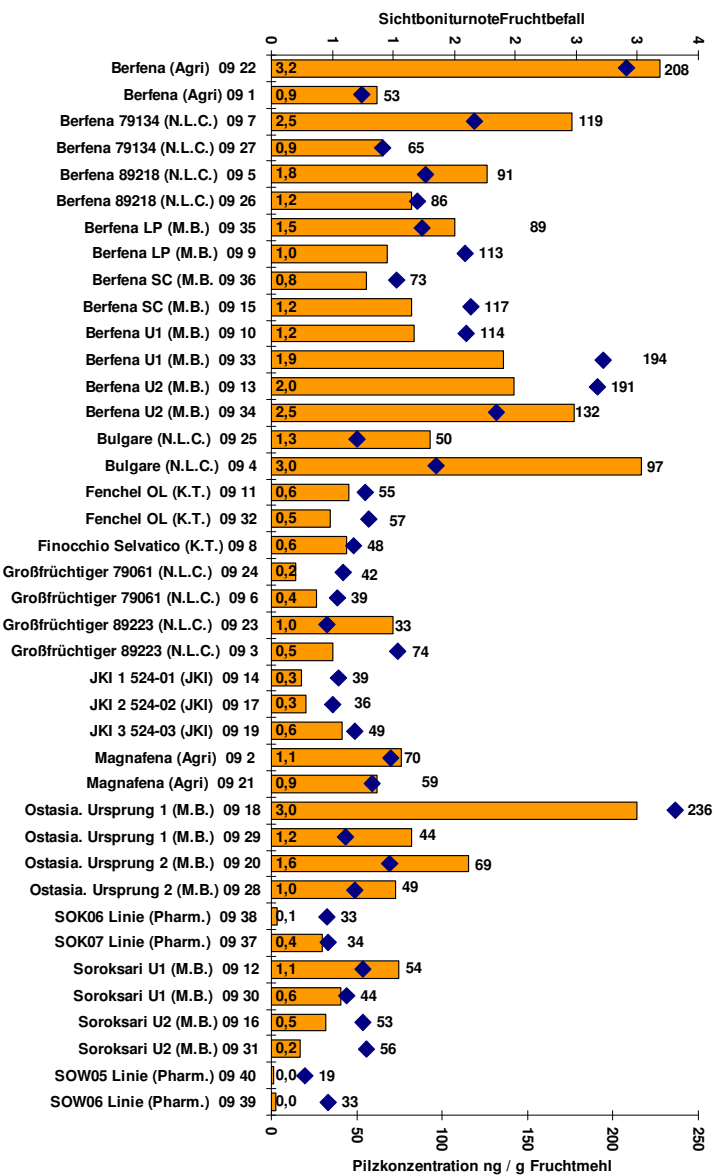


Abb. 23: Vergleich von Sichtbonitur der Feldversuchsernte QLB 2009 (Boniturnote = Säule und Wert unten) und umgerechneter ELISA-Wert (Pilzkontamination ng/g Samenmehl = Raute und Wert oben).

Die teilweise nicht übereinstimmenden Befallseinschätzungen könnten darin begründet sein, dass es bei der Sichtbonitur aufgrund einer Überbewertung der Befalls-symptome zu Fehleinschätzungen kam. Möglicherweise konnten die tatsächlichen Mycelmengen auch nicht exakt eingeschätzt werden. Da die Sichtboniturwerte subjektiv erhoben wurden und sich die Bewertung als sehr zeitraubend erwies, kann davon ausgegangen werden, dass der ELISA-Wert zutreffendere Ergebnisse erzielte. Bei der Sichtbonitur wäre sicherlich eine mehrmalige Bewertung der Chargen für eine statistische Auswertung notwendig. Hier wurden nur je 60 Früchte zur Bewertung herangezogen (siehe Sichtboniturschema Feldversuche). Der Vergleich sollte nur zur groben Absicherung des ELISA dienen und war daher nicht auf völlige Exaktheit angelegt.

Fazit

Der vorliegende PTA-ELISA lieferte aussagekräftige reproduzierbare Ergebnisse über die Kontamination der Fenchelfrüchte mit *M. anethi*. Grundsätzlich ist ein serologischer Test durch die Verwendung von Antikörpern immer gewissen Wertschwankungen unterworfen, die sich auch durch exaktes Arbeiten nicht völlig vermeiden lassen. Aus diesem Grund wurden die Eichreihen und Kontrollen auf jeder einzelnen Mikrotiterplatte mitgeführt. Die ausführlichen Ergebnisse der Feldversuche (Feldversuchsernten, aktuelle Probenmuster der Projektbeteiligten) werden nachfolgend dargestellt.

1.1.2.3.6 Beispielsberechnung der Pilzkonzentration (ng/g Fruchtmehl) und des prozentualen Befalls aus den Extinktionswerten des ELISA anhand von Proben eines Feldversuchs

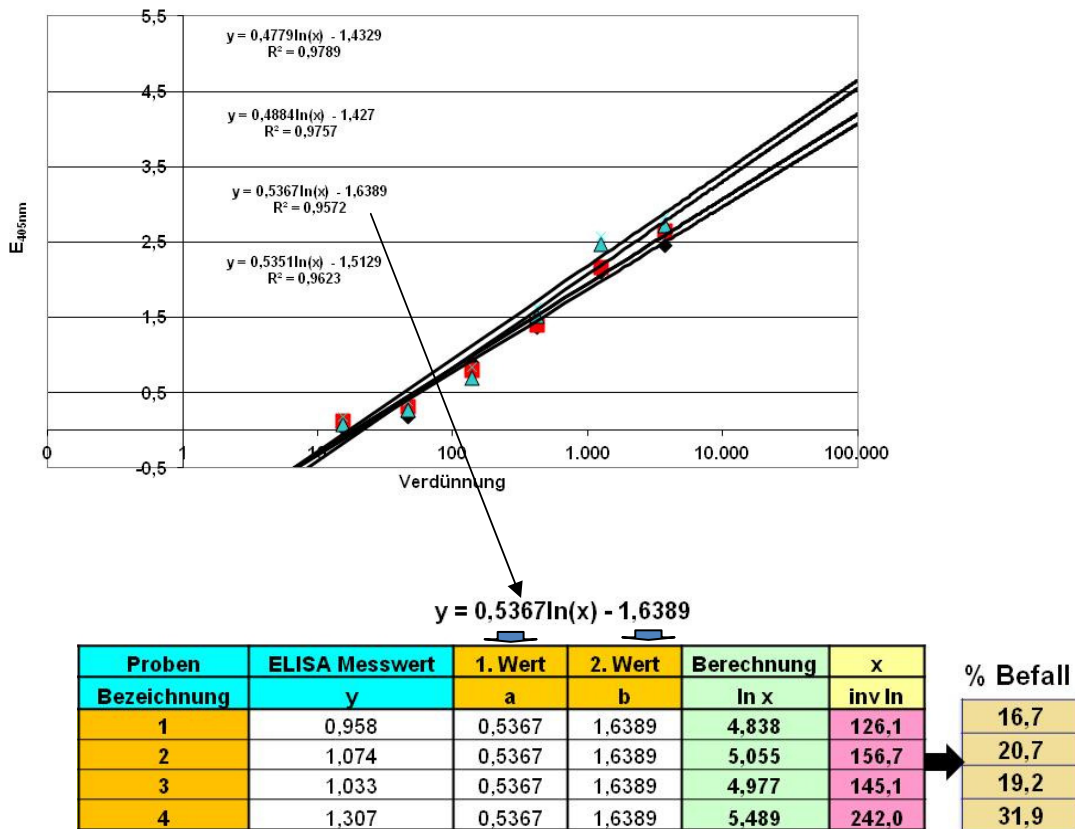


Abb. 24: Verrechnungsschema zur Ermittlung der Pilzkonzentration (ng/g Fruchtmehl) und des prozentualen Befalls mit *M. anethi*-Mycel anhand von Trendlinien der Eichreihen und den Extinktionswerten des PTA-ELISA.

Die Formel der Trendlinie wurde zur Berechnung von x umgestellt und der inverse Logarithmus gebildet, um den Pilzgehalt in ng/g Fruchtmehl zu berechnen (Abb. 24). Alle Werte, die bereinigten ELISA-Werte der Extinktion und die Faktoren der Formelgleichung, wurden dazu in eine Tabelle übertragen. Der prozentuale Befall der Proben wurde anschließend für jede Platte anhand des gemessenen Wertes der am stärksten befallenen Probe (stark befallener Standard = 100 % Befall) errechnet. Es handelte sich daher nicht um den prozentualen Anteil befallener Früchte, bei denen der Erreger nachgewiesen werden konnte, sondern um einen Vergleichswert zur am stärksten befallenen Probe, die völlig ausgereift und keimfähig beerntet wurde. Die Oberfläche dieser stark befallenen Früchte war mit Konidienlagern und Mycel völlig überzogen (Abb. 25). Durch diese prozentuale Umrechnung ließen sich unterschiedliche Tests und Prüfglieder von Feldversuchen vergleichen, die nicht von einer Person oder auf einer Platte durchgeführt wurden. Die Schwankungen in den Wertniveaus der einzelnen ELISA wurden vermindert, die Quantifizierung der Chargen wurde präziser und vergleichbarer.



Abb. 25: Übersichts- und Nahaufnahme von stark mit *M. anethi* befallenen Fenchelfrüchten der Standardsorte 7 (stärkster gefundener Befall innerhalb aller getesteter Fruchchargen).

Für die exemplarische Darstellung des Testablaufs und der Werteberechnung wurden nachfolgend die Befallswerte einer Charge eines Feldversuchs mit 48 Prüfgliedern ausgewählt (Abb. 26). Die Charge wurde zweimalig getestet, wobei es zu mehr oder weniger hohen Standardabweichungen kam. Dies konnte einmal testbedingt sein, andererseits waren die entnommenen Kleinproben aus der Gesamprobe immer etwas inhomogen. Das Mycel, was kugelig wuchs, wurde nicht vollständig zermahlen, eine gewisse Partikelgröße des Pilzes blieb erhalten und hob bzw. erniedrigte den Messwert. Es konnte eine signifikante Korrelation der beiden Tests nachgewiesen werden.

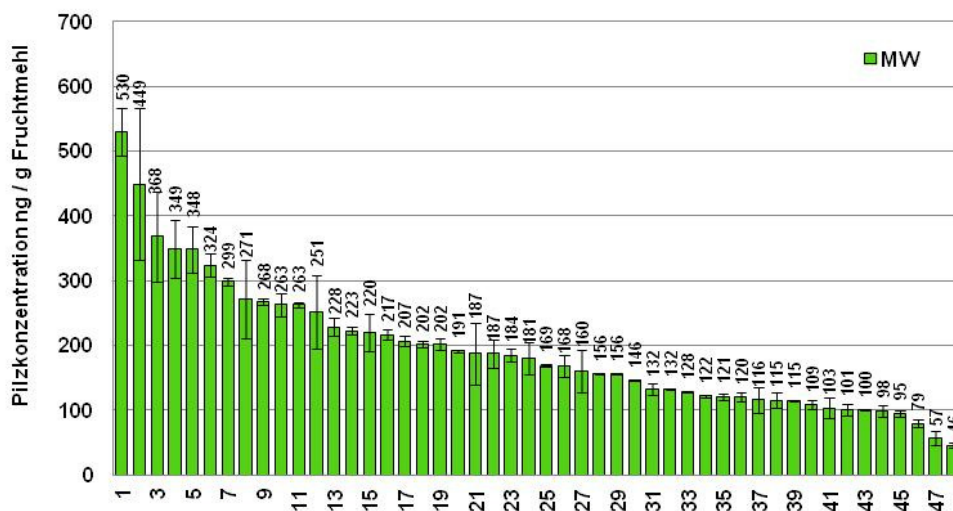


Abb. 26: Mittelwerte der ELISA-Testungen einer Charge (*M. anethi*-Mycelgehalt ng/g Fruchtmehl) Signifikante Korrelation zwischen zwei Tests ($r = 0,883$).

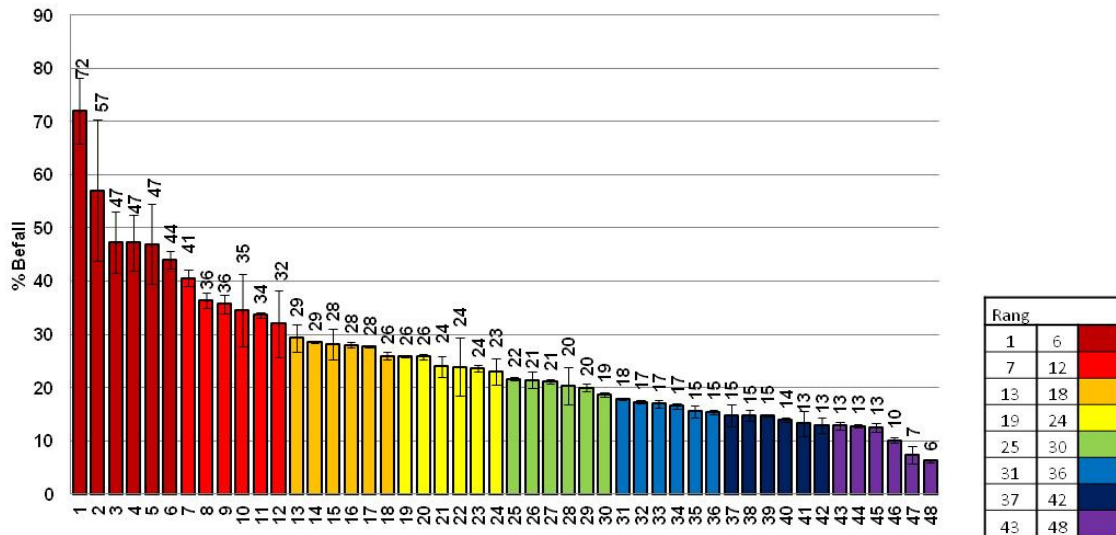


Abb. 27: Prozentualer Befall (*M. anethi*-Myzelgehalt im Vergleich zum stark befallenen Standard) einer Charge mit Befallsstärkenrangverteilung.

Nach der Umrechnung der bereinigten Extinktionswerte des ELISA wurde der prozentuale Befall (Abb. 27) der Prüfglieder ermittelt (siehe oben). Nachfolgend ließ sich der Rang eines jeden Prüfglieds innerhalb einer Charge ermitteln. Sortenunterschiede waren auf diese Weise gut zu erfassen.

1.1.2.3.7 Eignung des PTA-ELISA zum Feinnachweis von *M. anethi*

Neben der Reproduzierbarkeit der serologischen Testergebnisse sollte die Eignung des PTA-ELISA zum Feinnachweis des Erregers anhand von ausgewählten Proben untersucht werden (Abb. 28). Für die Testung wurden vier Saatgutproben ausgewählt, die sich bei früheren serologischen Testungen bzw. bei der Sichtbonitur als nur sehr gering befallen gezeigt hatten. Vor dem Test wurde der Befall von zwei Proben mittels Sichtbonitur (60 Einzelfrüchte) eingeschätzt. Der „Standard 0“ wies an 34 keinen und an 21 Früchten einen sehr geringen Befall auf. Bei „H Berfena“ waren 48 Früchte visuell befallsfrei und 12 sehr gering befallen. Die anderen Proben wurden nicht durch Sichtbonitur klassifiziert, bzw. lagen nur als Fruchtmehle vor.

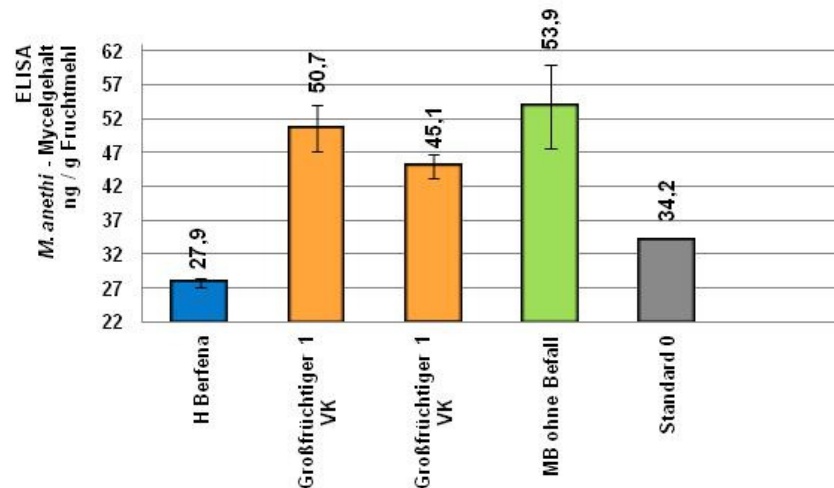


Abb. 28: Serologisch ermittelter *M. anethi*-Mycelgehalt in ng/g Fruchtmehl bei gering befallenen Proben.

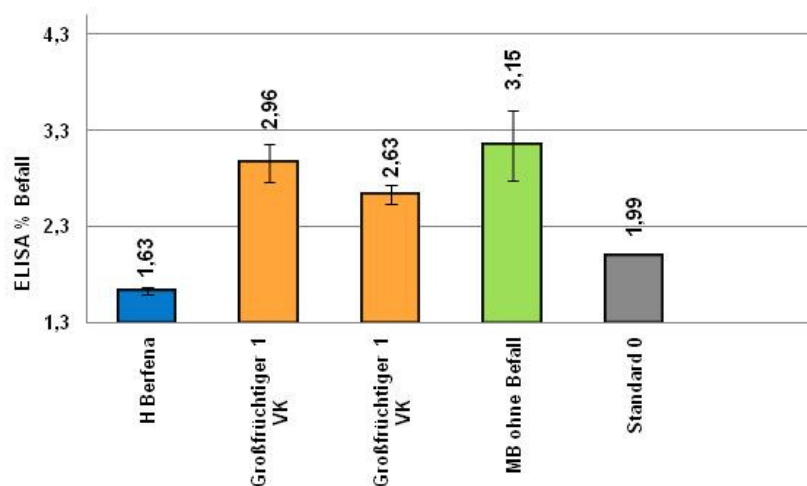


Abb. 29: Prozentualer *M. anethi* – Befall bei gering befallenen Proben.

Als Ergebnis zeigte sich, dass die Testempfindlichkeit des PTA-ELISA ausreichend für alle bisher vorhandenen und getesteten Proben war (Abb. 28 und 29). Der „Standard 0“ wies 34,2 ng/g bzw. 1,99 % Befall auf, „H Berfena“ war mit 27,08 - 29,14 ng/g bzw. 1,58 - 1,70 % noch etwas geringer befallen. Die Nachweisgrenze des Tests lag im Bereich 22,11 - 22,17 ng/g bzw. 1,29 % (Wert der Pufferkontrollen).

Dieser Schwankungsbereich war bei einem serologischen Test, der von der Bindung der Antikörper beeinflusst wurde, zu erwarten. Zusätzlich traten einige unspezifische Bindungen auf, die bei einem PTA-ELISA immer vorhanden und unvermeidbar waren.

Fazit

Die getesteten Proben wiesen zwar nur einen sehr geringen prozentualen Befall auf, es handelt sich hier aber um einen Vergleichswert zu einer sehr stark befallenen Probe. Im Gegensatz zu anderen Pathogenen, bei denen sich der prozentuale Befallswert auf die Anzahl infizierter Samen in einer definierten Charge bezieht, wurde hier die vorhandene Mycelmenge in der Gesamtprobe ermittelt.

Daher kann von diesem Befallsgrad nicht darauf geschlossen werden, wie sich der Erreger in der Probe verteilt, d. h. ob nur eine Frucht sehr stark infiziert war oder mehrere nur einen geringen Befall aufwiesen. Die stark infizierte Charge, der Standard, war trotz des starken Befalls noch sehr gut keimfähig (2009 > 80 %).

Nach unseren Untersuchungen war eine Befallsrate von nur 1,63 % (im Vergleich zur am stärksten verseuchten Probe) bei „H Berfena“ für eine Erstinfektion der Pflanzen nach der Keimung vollständig ausreichend. Das an 2 Standorten in den Jahren 2010 und 2011 gewonnene Erntegut wies einen deutlich höheren Pilzbefall auf als das Ausgangsmaterial (siehe Feldversuchsergebnisse):

Standort Quedlinburg: 49,1 % (2010) und 30,5 % (2011)

Standort Klein-Altendorf: 5,3 % (2010) und 7,9 % (2011)

Im Rahmen des jetzt abgeschlossenen Fördervorhabens sollte der Feinnachweis des Erregers weiter optimiert werden. Da keine gesicherte Gesundheitskontrolle zur Verfügung stand und noch keine molekularbiologische Nachweismethode zur Absicherung und Verfeinerung der Ergebnisse existierte, blieb nur die Vorselektion von einzelnen, sehr schwach befallenen Früchten durch Sichtbonitur. Mit diesen Früchten konnte die Nachweisgrenze von *M. anethi* präziser, aber nicht exakt ermittelt werden, bisher sind dem Feinnachweis „sichtbare“ Grenzen gesetzt.

1.1.2.3.8 Vergleich der Testempfindlichkeit von PTA-ELISA und Amplifikations-ELISA

Durch den Einsatz eines Amplifikationskits (Amplification System, Invitrogen) zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit des PTA-ELISA sollte geprüft werden, ob sich die Unterschiede zwischen niedrig befallenen Chargen präziser ermitteln ließen als mit dem herkömmlichen PTA-ELISA.

a) Material und Methoden

Beim Amplifikations-ELISA wird der Farbanteil einer bestimmten produzierten Menge der immobilisierten alkalischen Phosphatase in einem löslichen Substrat-Enzym-Immuno-Assay verstärkt (Abb. 30). Das Enzym wirkt hier auf ein Substrat, worauf dessen Produkt eine sekundäre zyklische Enzymreaktion auslöst, sichtbar durch ein farbiges Produkt (Formazan). Jedes einzelne Molekül des Endproduktes der ersten Reaktion nimmt an weiteren Zyklen der zweiten Reaktion teil, was das Signal weiter verstärkt. In einem herkömmlichen ELISA wirken dagegen die Enzyme direkt auf das Substrat und produzieren ein farbiges Endprodukt. Das produzierte Signal wird hier durch die lineare Art des Reaktionsablaufes begrenzt. Aus diesem Grund eignet sich der Amplifikations-ELISA für den Feinnachweis von z. B. pilzlichen Erregern, die nur sehr schwach konzentriert vorkommen.

Der Amplifikations-ELISA wird im Anschluss an einen herkömmlichen ELISA auf derselben Platte durchgeführt und der Grad des Farbumschlages (Abb. 31) wird bei einer anderen Wellenlänge ($E_{495\text{nm}}$) gemessen (Quelle: Invitrogen Instruction Manual ELISA Amplification System).

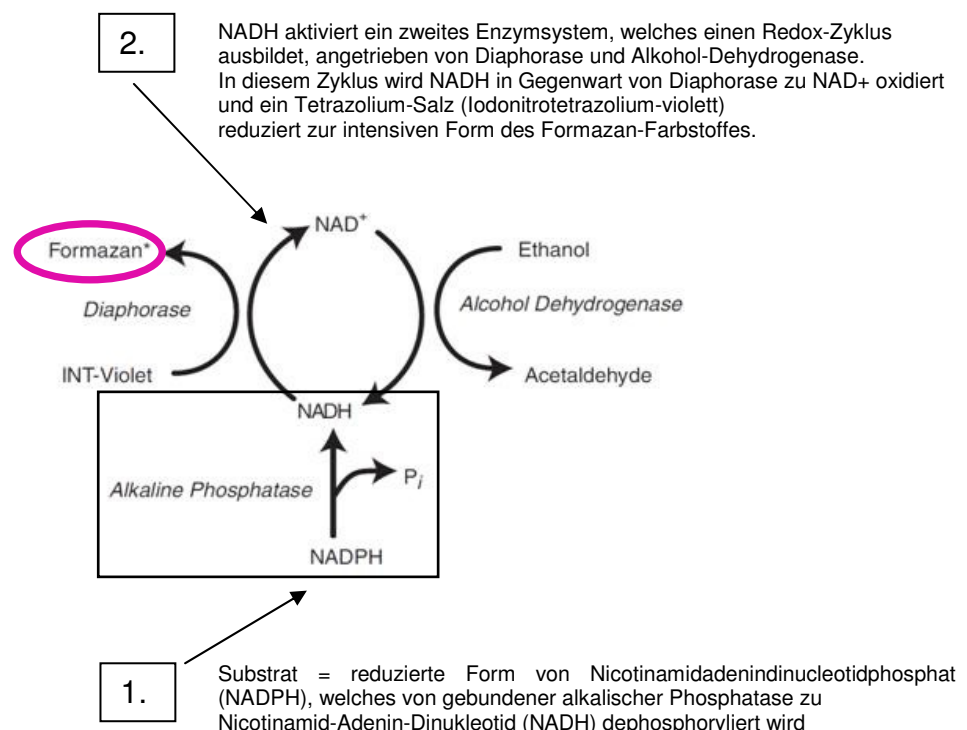


Abb. 30: Schema des Amplifikations-ELISA (verändert nach: Invitrogen Instruction Manual ELISA Amplification System). Grundsätzlich gibt es zwei Zyklen: ein Enzym wirkt hier auf ein Substrat (1), worauf dessen Produkt eine sekundäre zyklische Enzymreaktion auslöst (2), im Ergebnis wird ein farbiges Produkt (Formazan) gebildet.

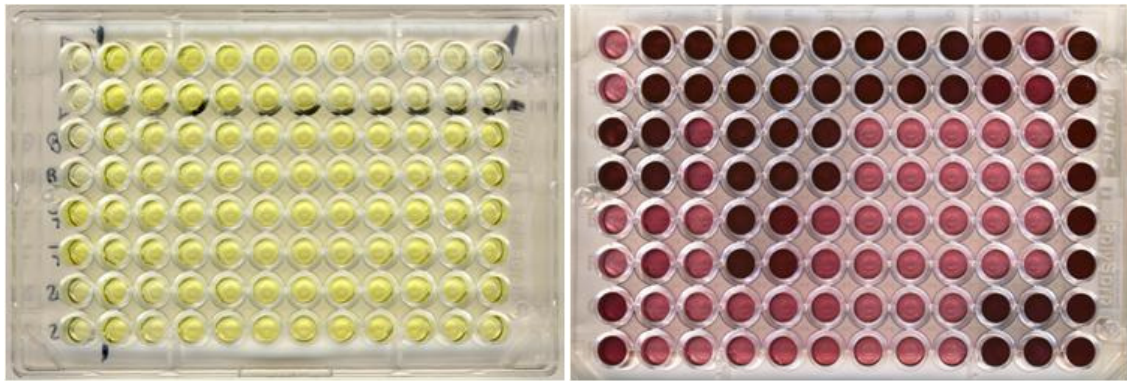


Abb. 31: Ansicht zweier ELISA-Mikrotiterplatten: herkömmlicher PTA-ELISA mit typischer gelblicher Färbung (links) und Amplifikations-ELISA (rechts) mit stark rötlichem Farbumschlag.

Für den Testvergleich wurden vier sehr wenig befallene Proben (siehe Feinnachweis), nach Sichtbonitur ausgewählt und zusätzlich mit diesem Testverfahren getestet. Die Verrechnung der Messwerte erfolgte auf dieselbe Weise wie beim PTA-ELISA.

b) Ergebnisse

Die Trendlinien der beiden ELISA-Varianten wiesen eine unterschiedliche Steigung auf (Abb. 32). Beim Amplifikations-ELISA waren die Probenwerte (trotz identischer Proben) um ca. 15,5 fach niedriger als beim herkömmlichen PTA-ELISA.

Die Testergebnisse (Fruchtbefall in ng/g Fruchtmehl und prozentual errechneter Befallswert) der beiden Systeme waren signifikant korreliert (jeweils $r = 0,647$) (Abb. 33 und 34). Der Grad der Übereinstimmung war nicht besonders hoch, da sich durch die Mittelwertbildung der Probenwiederholungen eine etwas andere Rangfolge der vier Proben der ELISA-Varianten ergab.

Grundsätzlich stimmten die Ergebnisse gut überein, beide Systeme waren gleichermaßen für die Quantifizierung des Befalls in diesem Pathosystem geeignet. Der Einsatz des Amplifikations-ELISA war nur bei sehr gering befallenen Chargen notwendig. Für die überwiegende Zahl der Fruchtproben war die Testempfindlichkeit des PTA-ELISA im Standardformat völlig ausreichend.

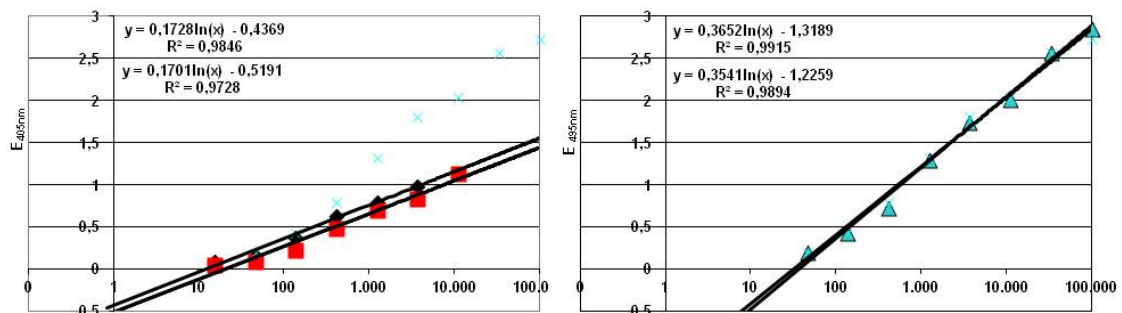


Abb. 32: Vergleich der Trendlinien eines PTA-ELISA (links) und eines Amplifikations-ELISA (rechts) bei vier identischen Proben (2 Tests, 6 Wdh. der Proben).

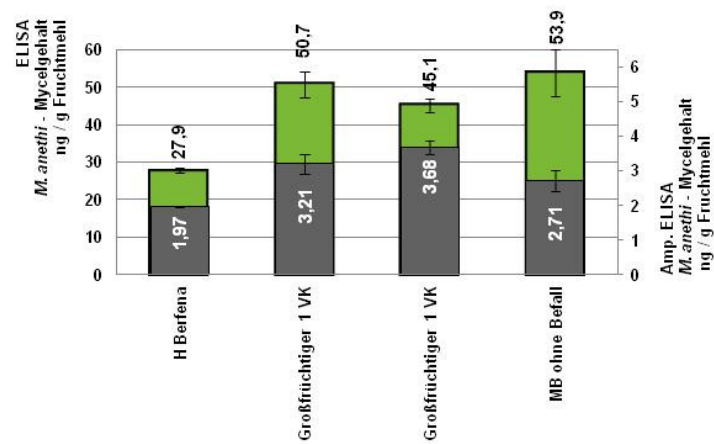


Abb. 33: Vergleich des *M. anethi*-Befalls in ng/g Fruchtmehl bei vier gering befallenen Fruchtchargen: PTA-ELISA (links bzw. grüne Säulen) und Amplifikations-ELISA (rechts und graue Säulen) Werte bei identischen Proben (2 Tests, 6 Wdh. der Proben).

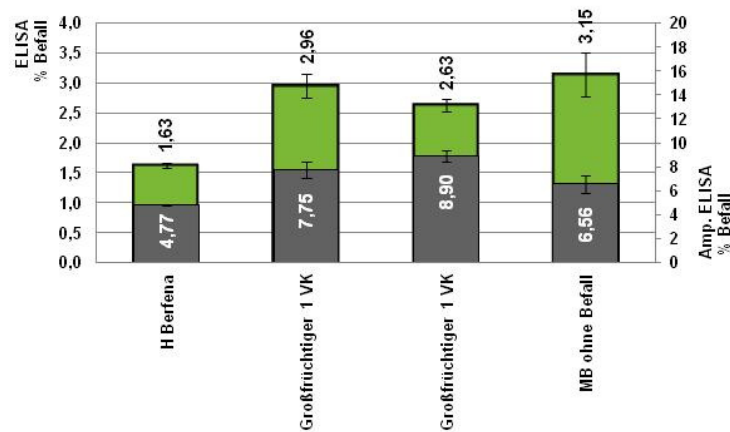


Abb. 34: Vergleich des prozentualen *M. anethi*-Befalls bei vier gering befallenen Fruchtchargen: PTA-ELISA (links bzw. grüne Säulen) und Amplifikations-ELISA (rechts und graue Säulen) Werte bei identischen Proben (2 Tests, 6 Wdh. der Proben).

1.1.3 Gesamtfazit Methodenentwicklung zum Erregernachweis

Von den Praxispartnern wurde in den ersten Planungen zum gerade abgeschlossenen Projekt eine möglichst feine Nachweismethode zum prozentualen Erregernachweis in Saatgut und Handelsware erbeten, die es möglich machen sollte, erregerefreies Material sicher auszulesen.

Bei einem Projektpartner lagen Fruchtchargen vor, von denen angenommen wurde, dass es erregerefrei sei. Diese Annahmen begründeten sich in mehrjährigem Anbau dieser Chargen, an denen durch Sichtbonitur keine Symptome festgestellt werden konnten. Nach unseren serologischen und molekularbiologischen Tests war das Material aber keineswegs erregerefrei. Durch den bisherigen Einzelpflanzenanbau beim Projektpartner waren die Symptome nur minimal aufgetreten. Der nachgewiesene Befall lag bei unserem Test bei 3,15 %, gegenüber 1,63 % der bisher am wenigsten befallenen Probe. Mit diesem Ergebnis wurde bestätigt, dass es momentan keine gesicherte Gesundheitskontrolle zur Testeinstellung gab.

Dieses Problem erschwerte die gesamte Testentwicklung und machte aufwändigere zusätzliche Arbeiten notwendig (z. B. Probenahmen bei Einzelpflanzen, Sichtbonitur zahlreicher Chargen aus dem Handel, Sichtung von Kleinstproben aus botanischen Gärten und Heilpflanzengärten etc.).

Mit der Entwicklung einer praxistauglichen, robusten Methode zum quantitativen Nachweis von *M. anethi* an Früchten war die wichtigste Aufgabe im Projekt gelöst. Mit dem semi-quantitativen PTA-ELISA war eine einfache, kostengünstige und sichere Methode vorhanden, um den Befall an Saatgutchargen erstmals objektiv quantifizieren zu können. Unter Mitführung einer definierten Konzentrationsreihe des Mycels konnte mit dem Test der Befallsgrad von Fruchtchargen aus Produktions- und Vermehrungsbeständen reproduzierbar bestimmt werden (siehe Ergebnisse Feldversuche).

Es wurde eine Testempfindlichkeit erreicht, die den Pilznachweis auch in scheinbar symptomlosen Fruchtproben möglich machte. 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.

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. Der Einsatz dieses Tests war nur für gering befallene Chargen notwendig, die Testempfindlichkeit des PTA-ELISA im Standardformat war für die überwiegende Zahl der Fruchtproben völlig ausreichend. Mit dem Test wurden alle Prüfglieder der Feldversuche sowie eingesandte Proben der Praxispartner mehrmalig untersucht. Eine Bewertung der Prüfglieder unterschiedlicher Sorten im Hinblick auf ihre Anfälligkeit gegenüber *M. anethi* war mit der entwickelten serologischen Testmethode sehr gut möglich (siehe Feldversuche).

Mit Hilfe des entwickelten ELISA gelang jedoch kein Erregernachweis in Jungpflanzen, die aus nachweislich pilzhaltigen Samen gezogen worden waren. Bei ihnen kommt der Erreger nur in minimalen Mengen vor, das Mycel war bisher im Presssaft nicht serologisch nachzuweisen. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Biologie des Erregers, d. h. in der Besonderheit von Wachstum und Ausbreitung in Fenchelpflanzen (siehe nachfolgendes Kapitel).

Von Beginn an waren die Arbeiten zur Methodenentwicklung auf die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode ausgelegt. Durch die auftretenden Probleme mit der DNA-Extraktion und dem sicheren, reproduzierbaren Erregernachweis in den befallenen Pflanzenteilen, waren aufwändigere Testabstimmungen notwendig, die zu zeitlichen Verzögerungen führten. Erst mit den neuen Primern waren auch geringe Mengen pilzlicher DNA mittels RT-PCR nachzuweisen.

Aus Zeitgründen konnten die sehr aussichtsreiche qRT-PCR leider nicht mehr optimiert werden. Daher wird dieser erste molekularbiologische Nachweis im Anschlussprojekt weiter optimiert werden, sodass auch hier eine Quantifizierung des Erregermycels möglich sein wird. Dabei wird sowohl an der Quantifizierung des Pilzes an Früchten als auch in Pflanzen gearbeitet werden. Es liegen bereits zahlreiche DNA-Präparationen aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial vor. Zusätzlich sollen die erzielten Ergebnisse zur serologischen Quantifizierung des Pilzes in Fruchtproben mit den Daten aus der qRT-PCR verglichen werden.

1.1.4 Zitierte Literatur

TAUBENRAUCH, K. (2007): Mykologische und epidemiologische Untersuchungen des Pathosystems *Mycosphaerella anethi* - Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Dissertation Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (http://www.tib.uni-hannover.de/spezielsammlungen/dissertationen/hannover/uebersichten/GGTSPU-styx.bba.de-31744-2017701-DAT/diss_07.pdf)

1.2 Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Biologie und der Pathogenese von *M. anethi*

1.2.1 Einleitung

Zum Verständnis der Pathogenese (speziell des Infektionsprozesses) und für den gesicherten molekularbiologischen und serologischen Erregernachweis war die genaue Erregerlokalisierung entscheidend für die Probenahme und den Erfolg aller nachfolgenden Untersuchungen. In der Literatur waren nur wenige Untersuchungen zu dieser Thematik zu finden (u. a. Sibia 1932, Petzoldt 1989 und 1990). Es handelte sich überwiegend um einzelne lichtmikroskopische Abbildungen der wesentlichen Mycelstrukturen von *M. anethi*, die zur Darstellung des Lebenszyklus und zur Bestimmung und Abgrenzung der Unterart dieses Ascomyceten notwendig waren. Umfangreiche Untersuchungen zur Mykologie wurden im vorangegangenen Projekt (1999 – 2002) durchgeführt (Taubenrauch 2007).

1.2.2 Material und Methoden

Zur Untersuchung des Infektionsprozesses und der genauen Erregerlokalisierung waren umfangreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Pflanzengewebe und Früchten notwendig. Zum präziseren Erregernachweis wurden zusätzlich Ultradünnschnitte von Früchten, Blättern und Stielen angefertigt und das pilzliche Gewebe mit goldmarkierten Antikörpern (JKI eigenes IgG zum Nachweis von *M. anethi*-Mycel) identifiziert. Dies war notwendig, um eine Fehlinterpretation der Bilder aufgrund der Besiedlung mit anderen pilzlichen Kontaminanten ausschließen zu können.

1.2.3 Ergebnisse

1.2.3.1 Erregerlokalisierung im Pflanzengewebe

1.2.3.2 Nachweis in befallenen Blättern

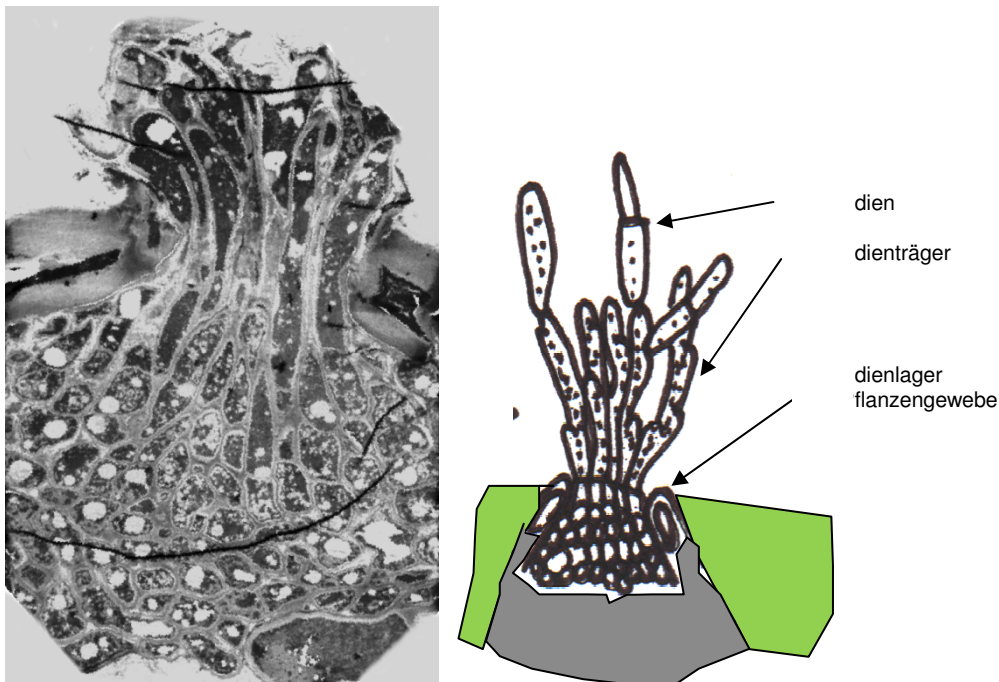


Abb. 35: Ultradünnschnitt (Querschnitt) durch ein Konidienlager von *M. anethi* in einem Fenchelstiel. Deutlich sichtbar die Konidienträger und die vorgebildeten Konidien (links). Schematische Zeichnung eines Konidienlagers (verändert nach Petzoldt 1989).

In befallenen Blättern waren, im Vergleich zum gesunden Blatt (Abb. 36), die Konidienlager sehr gut zu erkennen (Abb. 35 und 37).

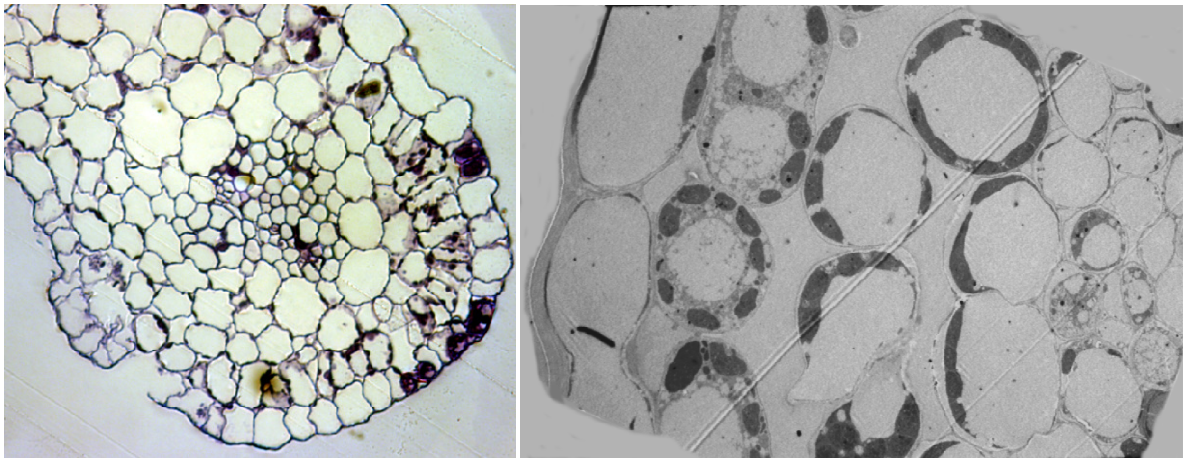


Abb. 36: Ultradünnschnitte eines gesunden Fenchelblatts ohne *M. anethi*-Befall (Übersichts- und Nahaufnahme).

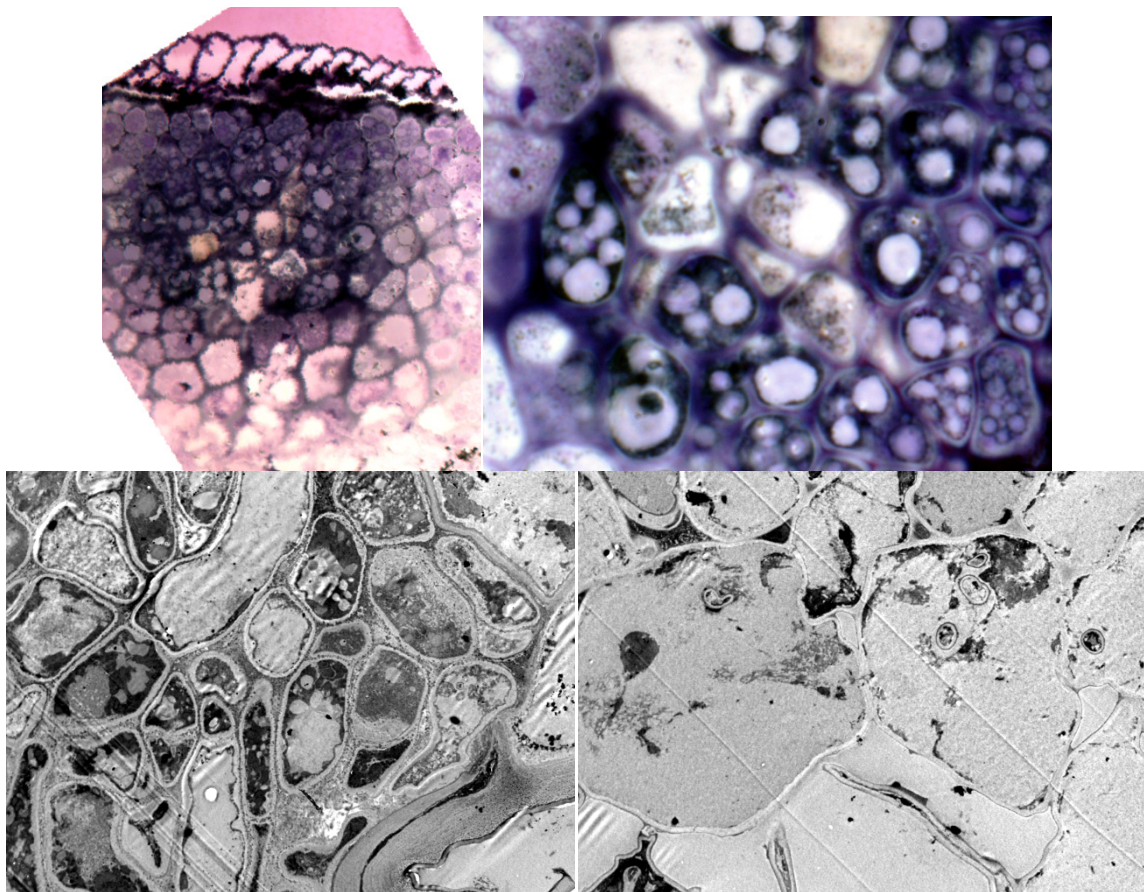


Abb. 37: Blattbefall von *M. anethi*: unreifes, kugelförmiges Konidienlager im Blattgewebe (oben links); lichtmikroskopische Nahaufnahme (100er Vergrößerung) des Mycels im Lagerinneren (oben rechts); Ultradünnschnitt durch ein Konidienlager mit pilzlichen Zellen (unten links); Ultradünnschnitt durch infiziertes Blattgewebe (große Zellen) mit einzelnen, runden, dickwandigen Querschnitten von *M. anethi*-Hyphen (unten rechts).

Das Mycel wuchs dicht zusammengeballt zwischen den Blattzellen, Gewebezestörungen erfolgten durch anhaltendes Wachstum der Lager. Zwischen den

Zellen war nur vereinzelt Mycel zu finden, die Konidienlager waren überwiegend verstreut in den oberen Schichten der Epidermis zu finden, verbunden lediglich durch einzelne Hyphen.

1.2.3.3 Erregerausbreitung im latenten Stadium

Die Erregerausbreitung im latenten Wuchsstadium des Pilzes wurde bisher kaum untersucht. Das sehr feine Mycel des Erregers wurde in Fenchelpflanzenteilen und im Fruchtgewebe durch mikroskopische (Färbetechniken, Immunfluoreszenz) und/oder serologische Methoden (Goldkolloidtechnik zum spezifischen immunelektronenmikroskopischen Nachweis von Mycel im Pflanzengewebe) lokalisiert.

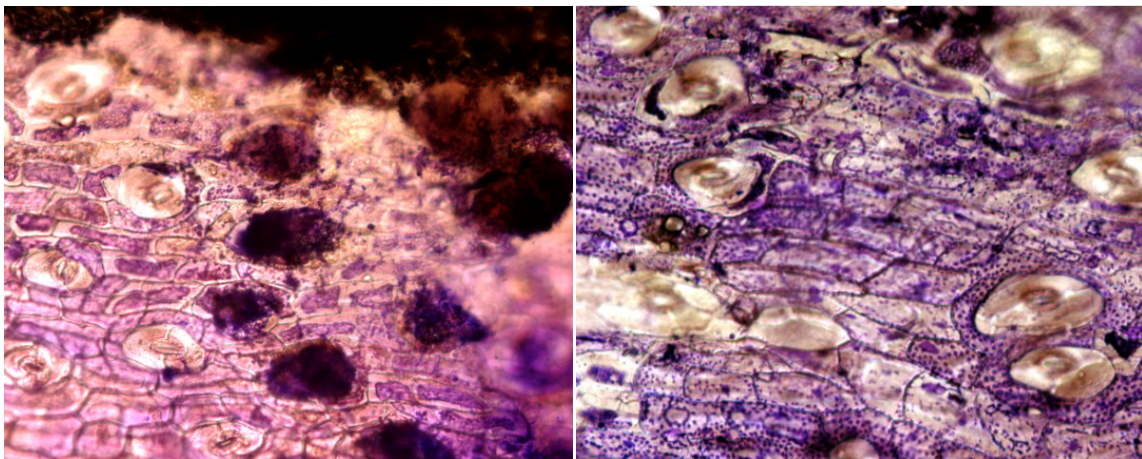


Abb. 38: Übersichtsaufnahme (links) einer Epidermirückseite und einer Epidermisoberseite (rechts) eines befallenen Fenchelstiels mit vorgebildeten *M. anethi*-Konidienlagern (Coomassie-Brillant-Blau Färbung).

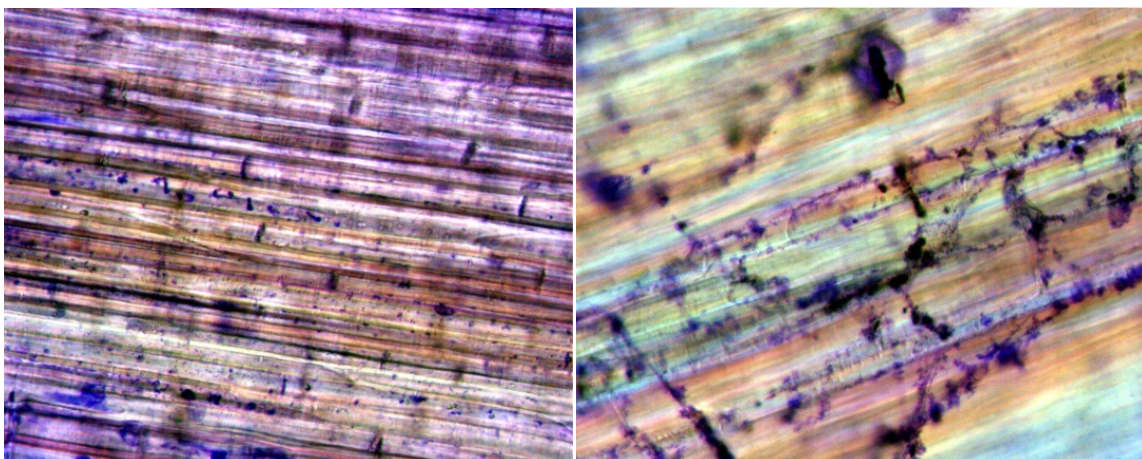


Abb. 39: Übersichts- (links) und Nahaufnahme (rechts) der Epidermirückseite eines befallenen Fenchelstiels mit *M. anethi*-Mycel (Coomassie-Brillant-Blau Färbung).

Mikroskopschnitte zeigten immer eine sehr unregelmäßige Mycelverteilung im Pflanzengewebe (Blattstiele, Blattfiedern, Pflanzenstängel etc.) von natürlich infiziertem Material. Ein Nachweis des Erregers gelang nicht bei jeder Probe.

Es musste daher zunächst durch wiederholte Beprobung bei anfälligem Pflanzenmaterial geklärt werden, wie die Gewebebesiedlung üblicherweise erfolgte. Da bisher in der Literatur keine Untersuchungen existierten, die Hinweise auf die Wuchsstrukturen von *M. anethi* bei der latenten Ausbreitung gaben, konnten die gefundenen pilzlichen Strukturen (Abb. 38 - 40) zunächst nicht klar *M. anethi* zugeordnet werden. Ein Fremdbefall mit anderen Pilzen war nicht auszuschließen, da es sich um Material aus einem Freilandbestand handelte. Eine Goldmarkierung des Erregers an den Epidermisschnitten gelang, aufgrund der sehr geringen Erregerdichte, nicht zufriedenstellend.

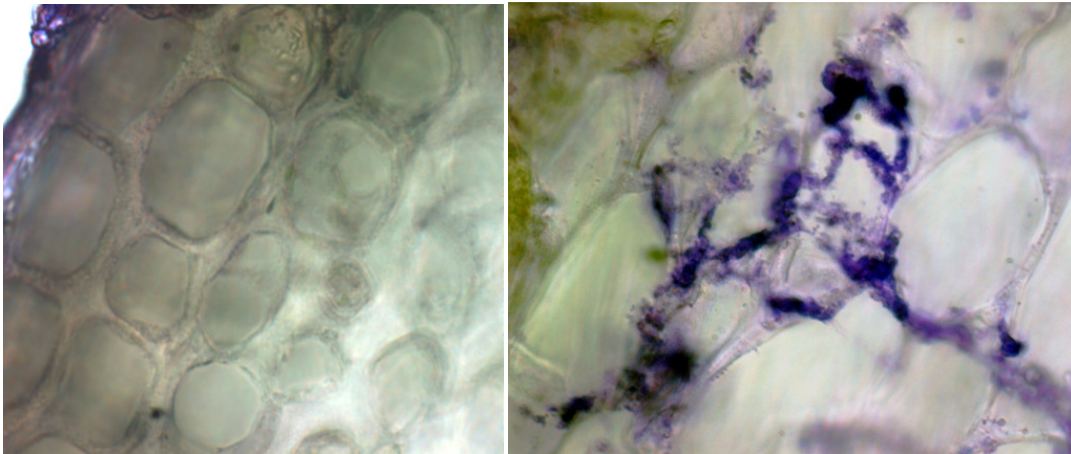


Abb. 40: Vergleich eines Stängelquerschnitts (Epidermisrückseite) eines gesunden (rechts) und eines latent mit *M. anethi* infizierten Fencheljungpflanzenstiels (Freilandaussaat, Probenahme Ende Mai) (Coomassie-Brillant-Blau Färbung).

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde in Sterilkulturen von *M. anethi* nach vergleichbaren pilzlichen Strukturen gesucht, die eine klare Zuordnung zum gesuchten Erreger erlaubte.

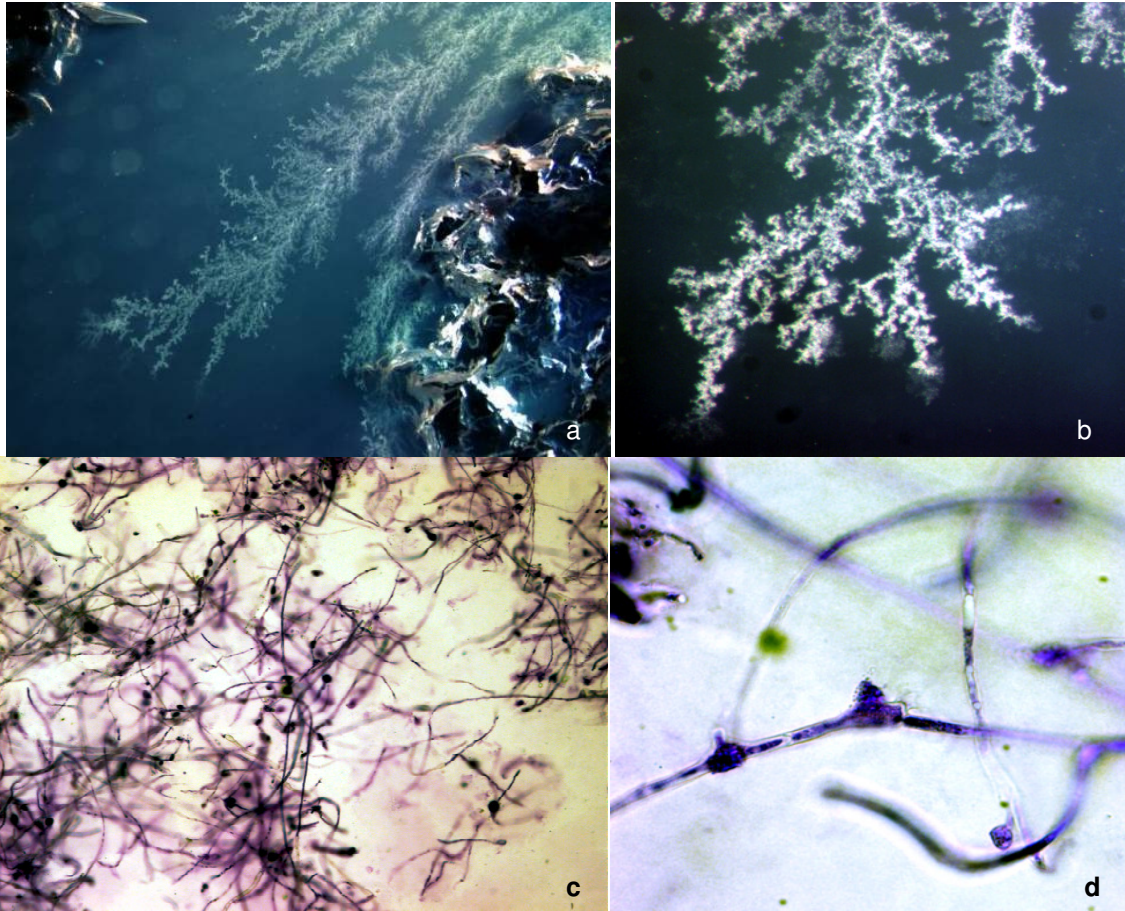


Abb. 41: Binokularansicht einer Sterilkultur von *M. anethi* mit Ausbildung von feinem weißen Mycel (a und b); Mikroskopaufnahme des Mycels mit typischen Verdickungen und langgestreckten Hyphen (c und d).

In älteren Sterilkulturen von *M. anethi* (Standzeiten über 6 Monate) wurde feines weißes Mycel gefunden, das anscheinend für die Ausbreitung im latenten Infektionsstadium verantwortlich war (Abb. 41). Es war in Kartoffeldextroseagar (KDA) sehr langsamwüchsig und bildete ein sehr fein verästeltes System. Das Mycel wies eine typische Struktur auf, die bereits von keimenden Konidien bekannt war. Einige knotenartige Elemente erinnerten an Haustorien, die sich in regelmäßigen Abständen etablierten und um die sich später kleinere Kolonien von dichterem Mycel bildeten. Diese Strukturen wiesen eine hohe Ähnlichkeit mit dem Freilandmaterial auf.

Für eine weitere Absicherung der mikroskopischen Ergebnisse wurden Dualkulturen angelegt, d. h. es wurden Blätter aus einer Sterilkultur und sporulierende pilzliche Sterilkulturen gemeinsam kultiviert und vermehrt.

Nach ca. 7 Monaten gemeinsamer Kultivierung zeigten sich die typischen punktförmigen *M. anethi*-Symptome auf den Blättfiedern (Abb. 42). Aus diesen Konidienlagern wurde unter den optimalen Feuchtebedingungen feines, weißes Mycel gebildet, was das pflanzliche Gewebe nachfolgend überzog und sich weiter verdichtete. Auf diese Weise konnten zusätzlich die Koch'schen Postulate in vitro erfüllt werden. Insgesamt waren das Erregerwachstum und die Symptombildung im Vergleich zu anderen Pilzen äußerst gering. Es konnte zwar angenommen werden, dass es sich bei den Dualkulturen nur um eine unvollständige Reproduktion des Pathosystems handelte, Ausbreitungszeitraum des Erregers erschien aber trotzdem äußerst lang.



Abb. 42: Symptome von *M. anethi* an einer Fenchelblattfieder in Dualkultur (gemeinsame Kultur von Fenchelblättern und *M. anethi* jeweils aus Sterilkultur) (Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau). Jüngere Hyphen von *M. anethi* wiesen immer eine weiße Färbung auf, die kugeligen Konidienlager waren dagegen immer bräunlich.

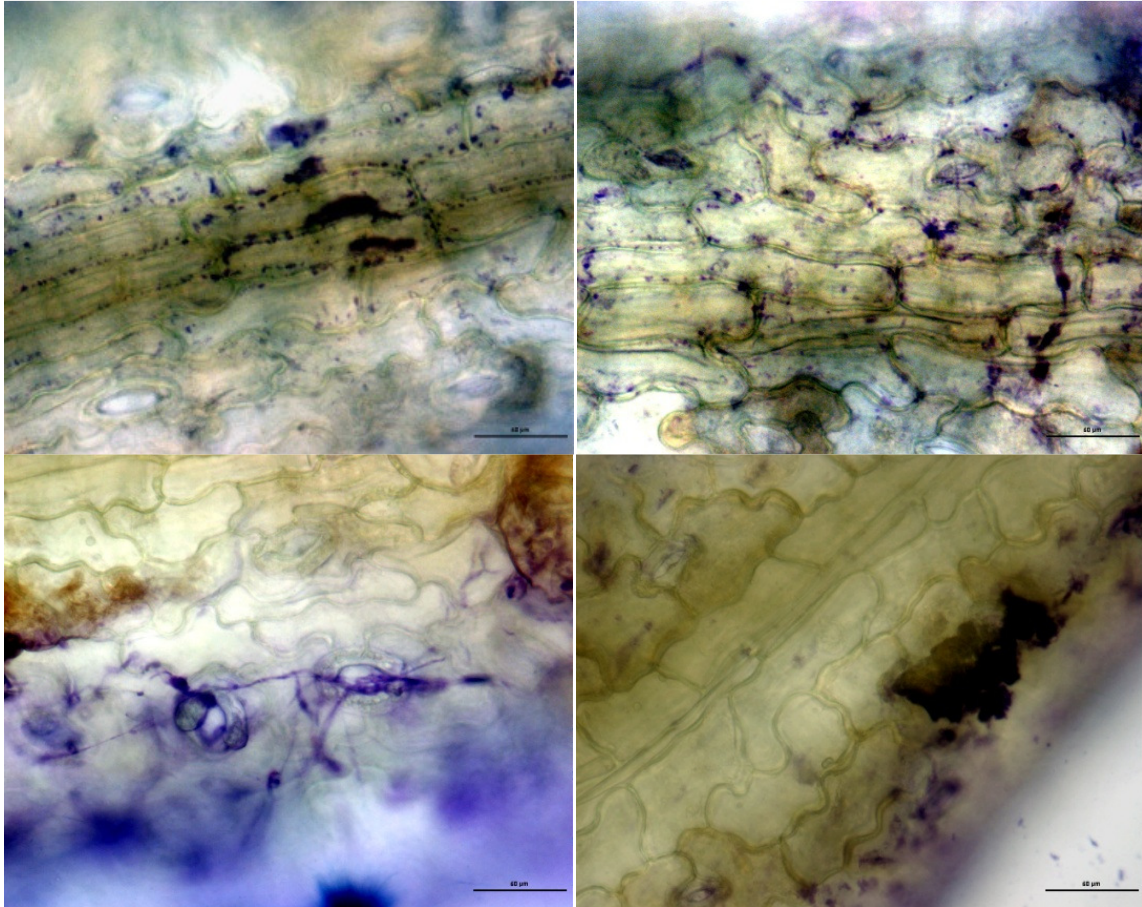


Abb. 43: Mikroskopischer Nachweis von *M. anethi*-Mycel in Dualkultur (gemeinsame Kultivierung von s.o.) an einer Blattfieder (Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau). Deutlich erkennbar die bläulich angefärbten Hyphen, die sich an den pflanzlichen Zellen ausgebreitet haben.

Wahrscheinlich profitiert der Erreger bei natürlicher Infektion der Pflanzen unter Freilandbedingungen durch seinen engen Kontakt mit dem pflanzlichen Gewebe von der Wüchsigkeit des Fenchels. Durch die Anheftung des Mycels in den Epidemiszwischenräumen verbreitete sich das Mycel während des Streckungswachstums im gesamten Gewebe, ohne selber größere Distanzen überwinden zu müssen.

Mikroskopaufnahmen des besiedelten Dualkulturgewebes (Abb. 43) zeigten das bereits an Freilandpflanzen gefundene typische Mycel mit den verdickten Enden.

Das Mycel ließ sich durch erste molekularbiologische und serologische Analysen eindeutig als *M. anethi* spezifisch identifizieren. Dieses Ergebnis wurde durch die mykologischen Befunde gestützt. Übertragene Mycelproben bildeten erneut die typischen schwarzen Pilzkörper auf KDA (Abb. 44).

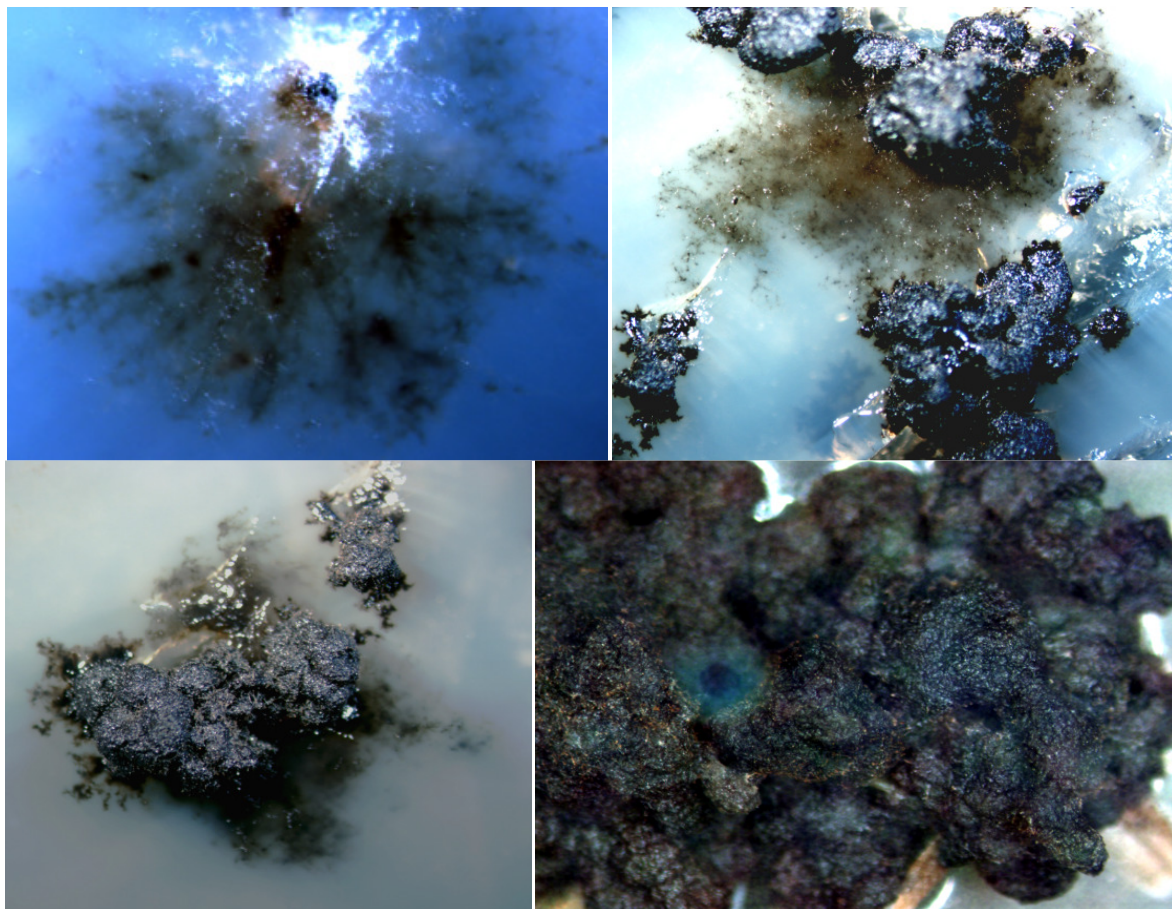


Abb. 44: Kulturentwicklung *M. anethi* nach der Umsetzung eines weißen Mycelstückes aus der Dualkultur auf KDA: Wachstum nach 2 (links oben), 6 (rechts oben), 9 (links unten) und 12 Monaten (rechts unten).

Fazit

In seiner latenten Entwicklungsphase von ca. 4 Monaten bildete der Erreger in seinem Wirt nur äußerst geringe Mengen eines feinen weißen Myzels. In Jungpflanzen konnte dieses Mycel nur sporadisch in den äußeren Epidermisschichten detektiert werden. Es wuchs nur in vereinzelt, kleinen Abschnitten des Stängelgewebes, größere Mycelansammlungen wurden nicht gefunden. Bedingt durch diese sehr feine Zellstruktur des Pilzes, waren die Lokalisation und der Nachweis im Pflanzengewebe aufgrund der geringen Dichte sehr schwierig.

Aktuell konnte der Pilz erstmals exemplarisch serologisch und molekularbiologisch im Stielgewebe von Jungpflanzen nachgewiesen werden. Bisher lagen die Messwerte sehr nah an der Nachweisgrenze, sodass nicht alle Tests umfänglich gesicherte Ergebnisse lieferten. Ein sicherer Nachweis im latenten Stadium würde das grundlegende Verständnis des Infektionsprozesses deutlich verbessern. Anscheinend lagerte sich das Mycel in diesem Wuchsstadium nicht bevorzugt in einem Pflanzenorgan an, sondern wuchs eng angelagert zwischen den Zellen. Nach den bisherigen Untersuchungen war die Erregerdichte im Knotenbereich der Stiele am höchsten, wobei das Mycel besonders in den äußeren Epidermisschichten zu finden war, wo größere natürliche Hohlräume existieren. Für einen gesicherten Nachweis müsste demnach dieses Material ausgewählt und getestet werden. Diese Tests sollen im Anschlussprojekt fortgeführt und optimiert werden.

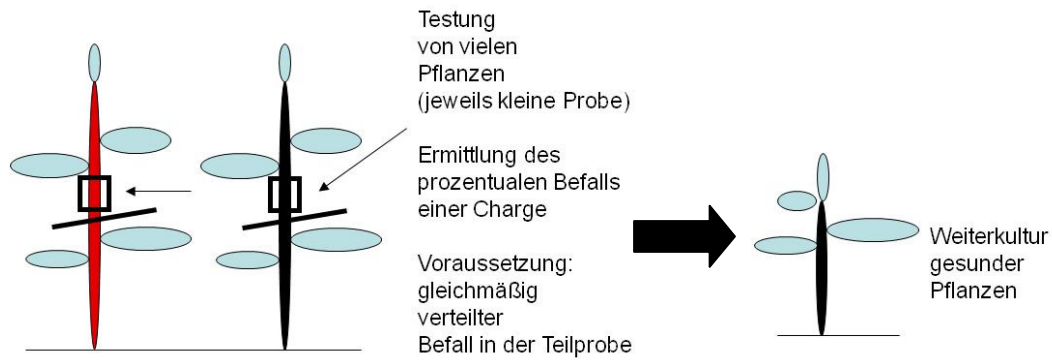


Abb. 45: Schema einer Gesundheitsprüfung von Gewebestücken von Jungpflanzenstielen zur Erzeugung von erregerefreiem Basismaterial.

Durch eine Befallsüberprüfung von Gewebestücken von Jungpflanzenstielen (Abb. 45) könnte für jede angezogene Pflanze ein Gesundheitszeugnis erstellt werden. Auf diese Weise wäre es möglich, alternativ zur Gewebekultur erregerefreies Basismaterial zu erzeugen.

Gleichzeitig könnte bei zahlreichen Testungen der prozentuale Befallsgrad einer Charge ermittelt werden. Diese Vorgehensweise ließe möglicherweise auch Rückschlüsse auf das Befallsniveau der Früchte einer einzelnen Dolde zu. Ein ausreichender Testumfang wäre hier entscheidend, um bei dem vorliegenden heterogenen Material gesicherte Aussagen treffen zu können.

1.2.3.4 Erregerlokalisierung an und in Früchten

Zum Verständnis der nachfolgenden Darstellungen werden hier einige botanische Grundlagen des Pathosystems kurz zusammengefasst. Speziell zum Aufbau der Früchte gab es einige Besonderheiten zu berücksichtigen, die für das Pathosystem bedeutsam waren.

Fenchelfrüchte sind Spaltfrüchte, die bei Abreife leicht in zwei Teile zerfallen. Die Innenseiten der Teilfrüchte, die dem Karpophor zugewandt sind, sind flach. Die Außenseiten dagegen mehr oder weniger stark gewölbt. In den je fünf Längsrippen liegen die Gefäßbündel, dazwischen die dunklen schizogenen Ölgänge (Ölstriemen). Der sehr kleine aufrechte spatelförmige Embryo liegt basal im oberen Ende des großen Endosperms eingebettet, welches sehr fett und proteinreich ist. Seine Länge beträgt nur ca. 40 % der inneren Fruchtlänge. Der Embryo wächst im Fruchttinneren heran, nach der Ausdifferenzierung der Kotyledonen verläuft die Keimung relativ schnell (Frohne und Jensen 1992, Kretschmer 1999). Das Hypokotyl ist nach oben gerichtet, d. h. die Keimwurzel wächst durch die Samenspitze aus (Abb. 46 und 47).

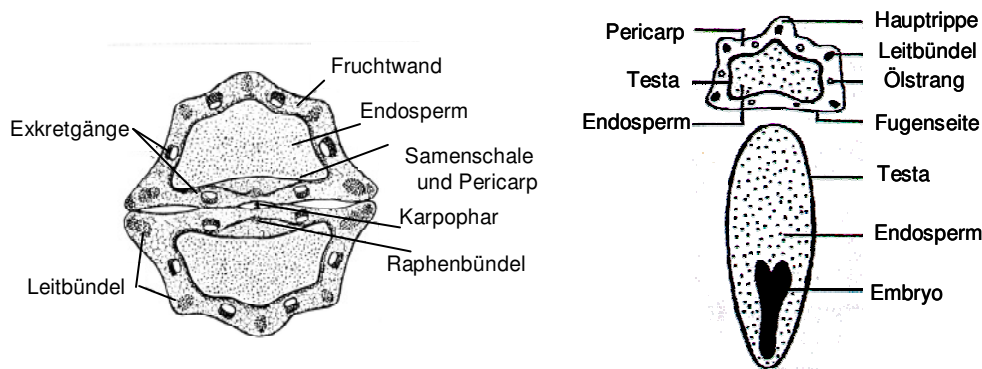


Abb. 46: *Foeniculum vulgare* Frucht quer (links) (verändert nach Frohne und Jensen 1992) und Längsschnitt (rechts) (verändert nach Kretschmer 1999).

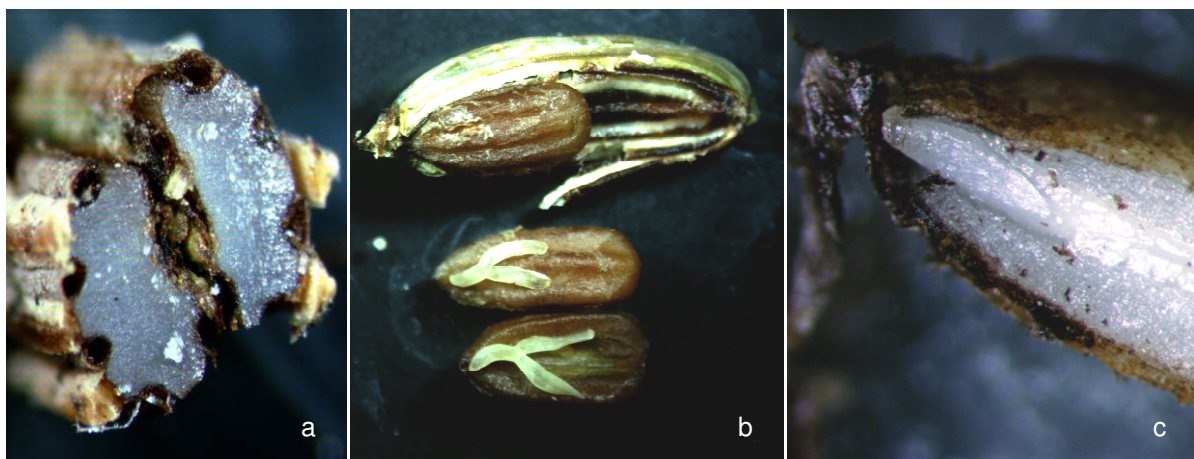


Abb. 47: *Foeniculum vulgare*-Frucht Querschnitt (a); Fenchelfrucht mit präpariertem Endospermkern und außen aufgelegtem Embryo (b); Keimung einer Fenchelfrucht mit durch das frühere Narbengewebe austretender Keimwurzel.

Die bisherigen mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass *M. anethi* auf zwei Wegen in die Fenchelfrüchte gelangen konnte. Das feine Mycel wuchs sowohl von innen über das Doldengewebe als auch von außen durch auf der Narbe auskeimende Konidien in die grünen Früchte ein. Sowohl im Narbengewebe als auch in

den grünen Fruchtsielchen war vereinzelt Erregermycel mikroskopisch nachzuweisen. Eine Identifizierung des pilzlichen Gewebes mittels goldmarkierter Antikörper war erfolgreich (Abb. 48).

Umfangreiche serologische Untersuchungen (DTBIA auf einer Nitrocellulosemembran) von grünen Früchten wiesen das Erregermycel vereinzelt im Gewebe nach, bevor äußere Symptome auftraten. Die Früchte einer Dolde waren nicht einheitlich infiziert bzw. die Erregermenge reichte für einen gesicherten Nachweis nicht immer aus.

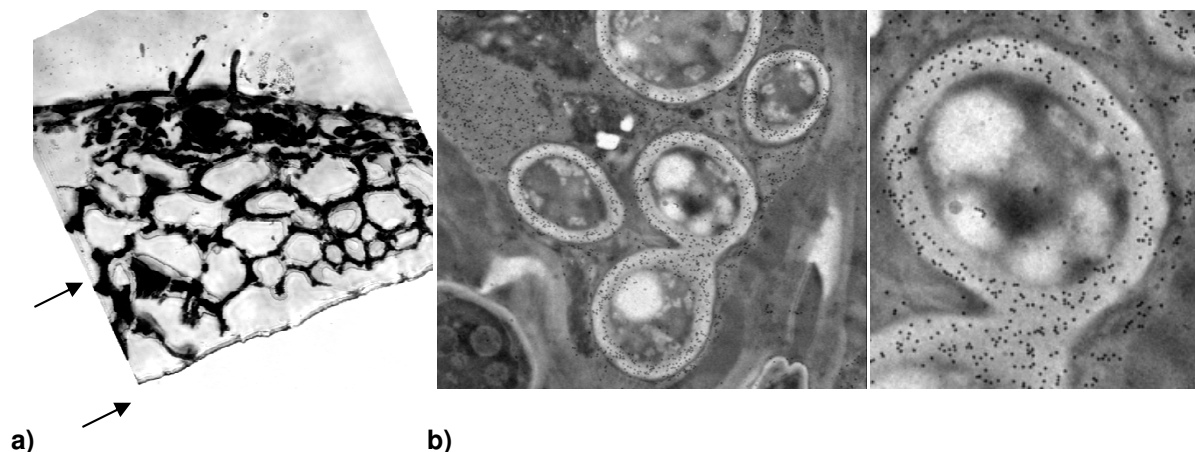


Abb. 48: **a:** Ansicht eines Fruchtstücks mit aufbrechendem Konidienlager und dichtem Mycel zwischen den Zellen (Pfeile); **b:** Nahaufnahmen eines Fruchtstücks mit eingewachsenem Mycel (weißlicher Rand), nach Dekoration mit goldmarkierten *M. anethi*-Antikörpern

In Ultradünnschnitten konnte bisher kein Mycel im Endospermkern gefunden werden. Falls hier eine Pilzinfektion erfolgt, bleiben die Mycelmengen sehr gering.

Grundsätzlich wurde beobachtet, dass es bei einer vollständigen Abreife der Früchte zu keinen Schädigungen oder Beeinflussungen der Keimung durch den Erregerbefall kam. Auch bei sehr starken äußerlichen Symptomen erfolgte eine normale Keimung. Es kann daher grundsätzlich nur von einem sehr geringen Initiativbefall des Endospermgewebes ausgegangen werden. Erste serologische Testungen (PTA-ELISA) der Endospermkerne waren negativ. Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen zu dieser Thematik sollen im Anschlussprojekt erfolgen.

Im Binokular waren in der unmittelbaren Umgebung der Endospermkerne (äußeres braunes Hüllgewebe der Kerne) größere Mycelmengen zu erkennen. Dieses Mycel konnte auch mittels DTBIA nachgewiesen werden (Abb. 49).

Dazu wurden das Fruchtmehl und die gewaschenen Endospermkerne auf eine Nitrocellulosemembran gedrückt und die Membranabdrücke mittels IgG zum *M. anethi*-Mycel-Nachweis violett (durch Substratlösung mit Nitroblue-Tetrazolium-Cjhlrid) angefärbt (Anleitung zu finden in: Taubenrauch 2007).

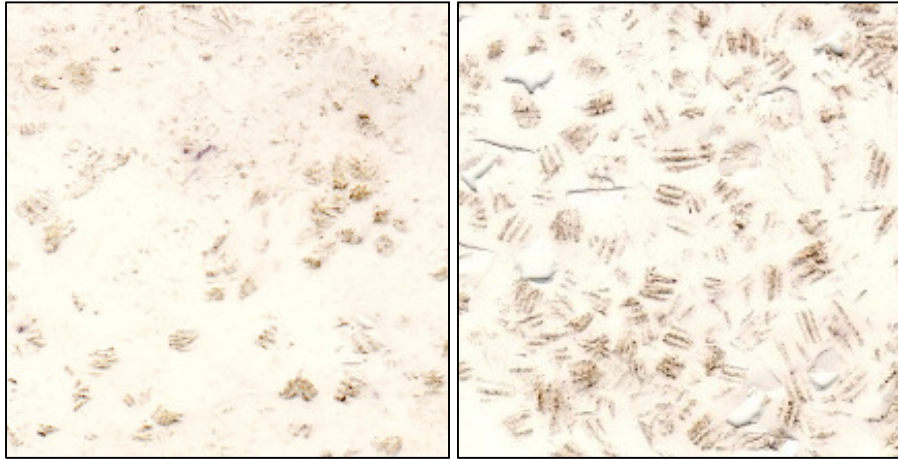


Abb. 49: DTBIA von Fruchtmehl (links) und gereinigten Endospermkernen (rechts) von sichtbar befallenem Ausgangsmaterial. Anhand der violetten Färbung kann *M. anethi* in den Anhaftungen der Membranabdrücke lokalisiert werden.

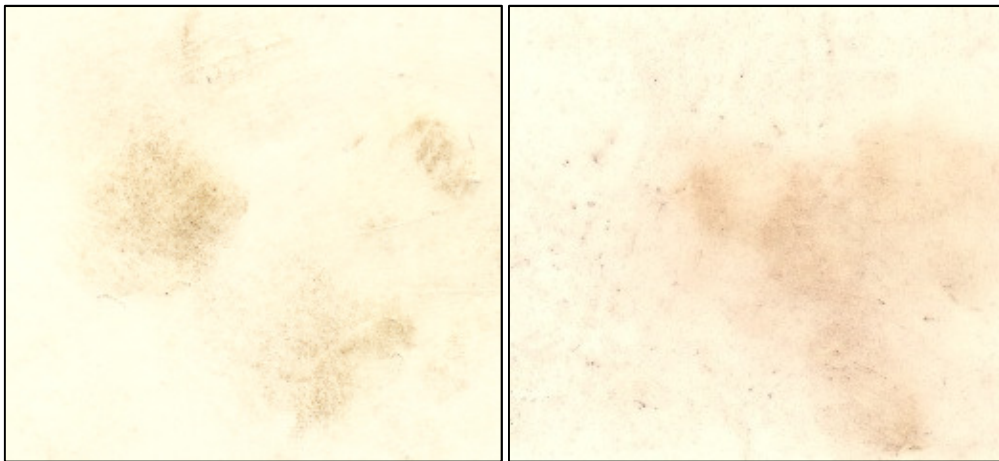


Abb. 50: DTBIA von zerschlagenen Endospermkernen. Kerne (links) stammte aus einer Charge ohne sichtbaren Befall; rechts aus Charge mit starkem Befall. Anhand der violetten Färbung kann *M. anethi* in den Anhaftungen der Membranabdrücke lokalisiert werden.

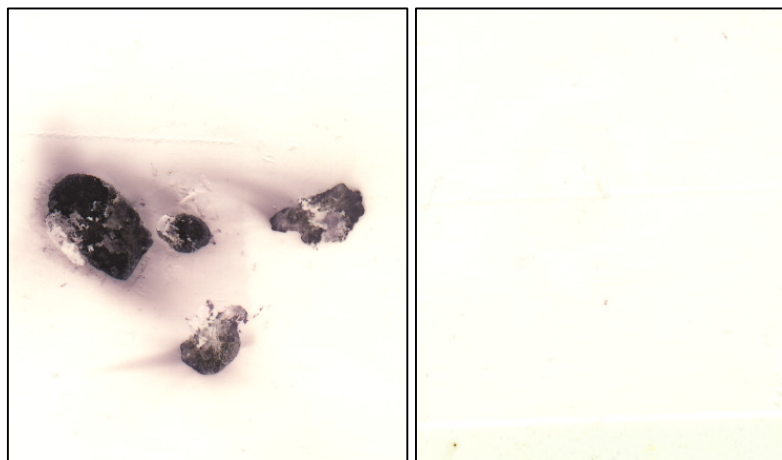


Abb. 51: DTBIA von frischem weißem *M. anethi*-Myzel (links) und einer Agarkontrolle (rechts). Anhand der violetten Färbung kann *M. anethi* in den Anhaftungen der Membranabdrücke lokalisiert werden.

Mittels DTBIA konnte nachgewiesen werden, dass sich *M. anethi*-Mycel in der Fruchthülle, den ganzen Endospermkernen und auch in der unmittelbaren Umgebung der gewaschenen, zerdrückten Endospermkerne befand, auch wenn nur äußerst gering befallene Früchte getestet wurden (Abb. 49 und 50). Die Kontrollen (Abb. 51) dienten der Testüberprüfung.

Es scheint daher möglich zu sein, dass sich der Keimling, bereits während der ersten Keimphase, beim Durchtritt der Keimwurzel durch das ehemalige (meist stark befallene) Narbengewebe, infizieren kann (siehe Abb. 47 rechts und 52).

Ein Übergang in das Endospermgewebe scheint daher für eine gesicherte Infektion nicht notwendig zu sein. Da die normale Keimdauer von Fenchelfrüchten, je nach Temperatur, 7 - 14 Tage dauert und beide Partner zusammengedrängt in einer gut geschützten, feuchten Umhüllung existent sind, erscheint eine nahezu 100 %ige Infektion der Pflanzen durchaus möglich.

In mykologischen Versuchen ließ sich nachweisen, dass *M. anethi* sogar von völlig ausgetrockneten KDA-Platten erfolgreich auf frischen Agar umsetzen ließ und sich innerhalb einer Woche regenerierte. Es wurde sogar überwiegend weißliches schnellwüchsiges Mycel gebildet, was zu einer deutlichen Mengenzunahme führte.

Dieses Mycel ist höchstwahrscheinlich für Keimlinge stark infektiös und könnte sich daher schnell in den Pflanzen ausbreiten.

1.2.3.5 Befallsquantifizierung bei Fenchelfrüchten

Für die Befallsbeurteilung von Früchten war es für einen praxistauglichen Test wichtig, einen spezifischen Erregernachweis zu entwickeln, mit dem eine große Anzahl von Prüfgliedern objektiv verglichen werden konnte. Da Doldenblütler unterschiedliche Doldenordnungen bilden, die zu unterschiedlicher Zeit blühen und uneinheitlich infiziert werden, handelt es sich beim Erntegut um eine Mischung mit sehr unterschiedlichen Befallsstärken.

Es war daher wichtig, eine ausreichend große Probe zu untersuchen, die den tatsächlichen Befallsstatus wiedergab. Einzelne Früchte, bzw. geringe Stückzahlen (10 - 30), repräsentierten keinesfalls einen ganzen Bestand. Da *M. anethi* auch stark an den Doldenstielen zu finden war, spielte der Grad der Reinigung der Fruchtproben ebenfalls eine bedeutende Rolle. Besonders taube Früchte, die durch eine starke Epidemie nicht weiterentwickelt wurden, konnten das Befallsniveau verfälschen, da sie deutlich geringere Befallswerte aufwiesen als reife. Eine gute Vorreinigung sollte daher in jedem Fall erfolgen.

Bei Betrachtung des Fruchtbefalls zeigte sich, dass der Pilz auf der äußeren Fruchthülle mehr oder weniger stark ausgeprägte, unregelmäßige Konidienlager bildete, deren Ausmaß sehr stark variierte. Selbst zwei Seiten einer Spaltfrucht wiesen unterschiedliche Symptomstärken auf. Im Inneren waren keine Mycelansammlungen sichtbar. Rein optisch konzentrierten sich die Schädigungen auf Gewebe, was nur noch dem Schutz des Endosperms und damit dem Keimling diente. Daher war auch bei starkem äußerem Befall eine normale Keimung möglich (Abb. 52).

Zwischen Sorten waren unterschiedliche Symptomausprägungen zu beobachten; meist ergaben sich Kolonien von mehreren Lagern nebeneinander, es kamen aber auch regelmäßige Sprenkelungen mit einzelnen Lagern über die gesamte Fruchtaußenseite vor. Häufig war die Fruchtspitze (ehemaliges Narbengewebe) mit Lagern überzogen. Auch die Reste von Fruchtstielen wurden bevorzugt befallen.

Die flachen Innenseiten der Spaltfrüchte und der Endospermkern mit dem Embryo zeigten keine Symptome. Es ist aber zu erwarten, dass in diesem Gewebe ebenfalls feine Mycelstränge vorhanden sind und den Keimling infizieren können. Diese äußerst geringen Mycelmengen sind nur schwer nachzuweisen (siehe DTBIA).

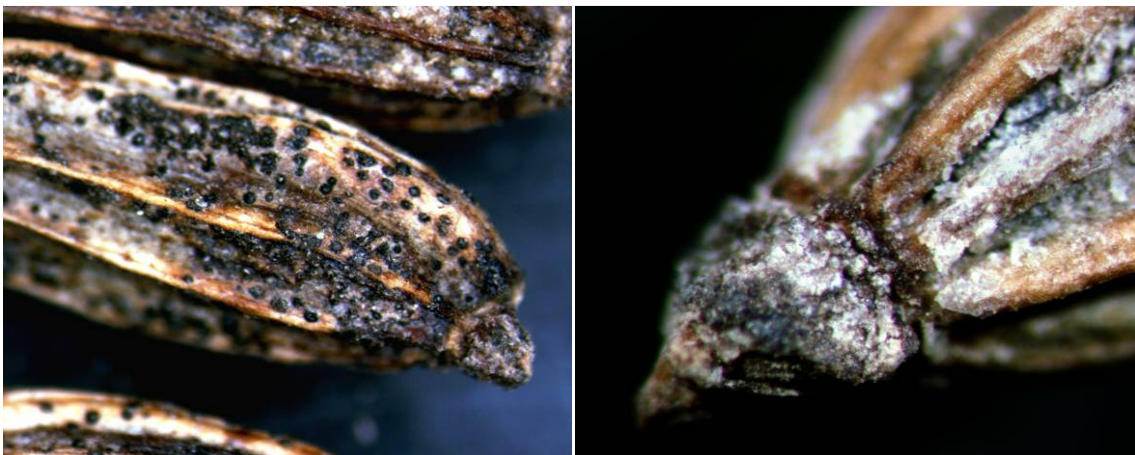


Abb. 52: *M. anethi*-Symptome auf Fenchelfrüchten (links) und in der Nahaufnahme auf der Fruchtspitze (früheres Narbengewebe) (rechts).

Durch umfangreiche lichtmikroskopische Untersuchungen wurde der Fruchtbefall der in die Untersuchungen einbezogenen Fenchelsorten und -genotypen vergleichend differenziert. Da sich die Symptome bei Sorten unterschiedlich stark ausprägten,

wurden zahlreiche Sortenmuster verglichen, um eine Befallseinstufung einzelner Früchte bzw. ganzer Chargen vornehmen zu können.

Mit diesem Boniturschema (Abb. 53) wurden die eingesandten Proben der Projektbeteiligten nach Befall klassifiziert, um die zu einwickelnde Methode auf ihre Aussagekraft zu validieren. Es musste geprüft werden, ab welcher Probengröße ein reproduzierbarer Befallswert zu erzielen ist. Die Früchte von Fenchel waren sehr heterogen befallen. Jede Charge setzte sich aus einer Mischung aus verschiedenen Doldenordnungen zusammen, jüngere Dolden waren weniger stark infiziert.

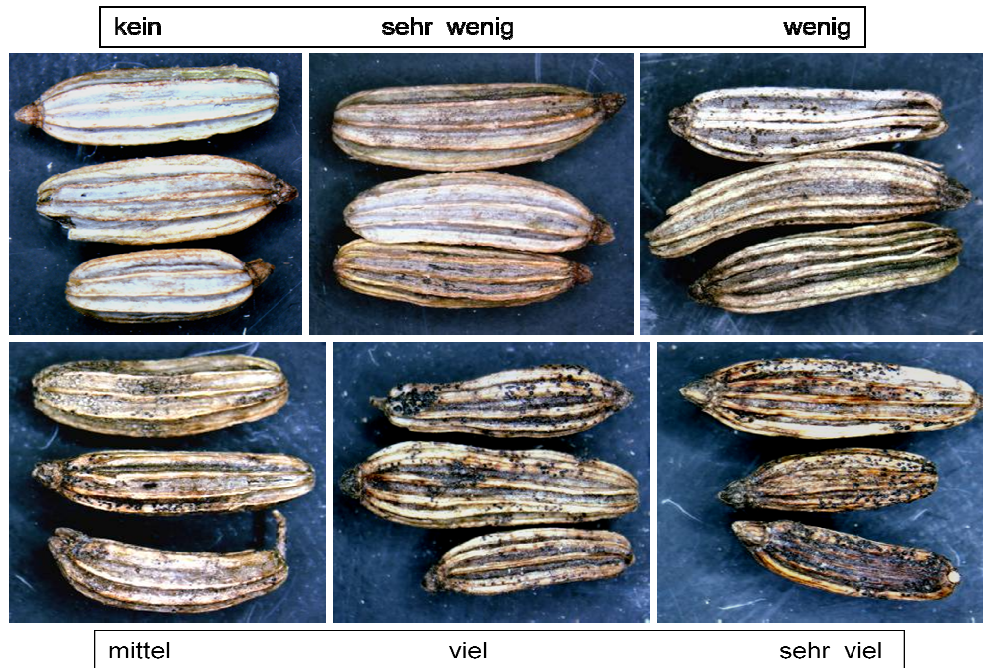


Abb. 53: Sichtboniturschema des Fruchtbefallsgrades für Einzelfrüchte (Bonitur von mindestens je 60 Früchten je Charge notwendig für eine gesicherte Eingruppierung). Deutlich sichtbar die kleinen schwarzen Konidienlager auf den Fruchtoberflächen.

Fazit

Der überwiegende Anteil der Konidienlager befand sich auf der äußeren Fruchthülle, das Endosperm war kaum sichtbar infiziert. Für den großflächigen Anbau und die Vermarktung von Konsumware war ein robuster und aussagekräftiger Test zu entwickeln, der auf die Bedürfnisse der abnehmenden Industrie ausgerichtet sein sollte und reproduzierbare Aussagen über das Befallsniveau von Chargen ermöglichte. Für die Bestimmung des quantitativen Befalls konnte daher die zermahlene Fruchthülle ohne Endosperm getestet werden, ohne das Ergebnis zu beeinflussen.

Zusätzlich ließ die Symptombildung des Pilzes Rückschlüsse auf die Krankheitsentwicklung während des Feldanbaus, auf Anfälligkeit, Wuchseigenschaften von Pflanzen und den Nutzen von Pflanzenschutzbehandlungen zu (siehe Feldversuchsergebnisse).

1.2.4 Zitierte Literatur

FROHNE, D. und JENSEN, U. (1992): Systematik des Pflanzenreichs unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

KRETSCHMER, M. (1999): Optimale Keimtemperaturbereiche und Dormanz bei *Apiaceae* – Saatgut. Gemüse 9, 526 - 528

SIBILIA, C. (1932): Un parassita del finocchio. Boll. Staz. Path. Veg. Roma 12, 210 - 235

PETZOLDT, S. (1989): Zur Biologie und Schädigung des Erregers der Blatt- und Stengelanthraknose (*Mycosphaerella anethi* Petr.) am Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) - 1. Mitteilung. Drogenreport 3, 49 - 65

PETZOLDT, S. (1990): *Mycosphaerella anethi* - Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte. Boletus 14, 49 - 56

TAUBENRAUCH, K. (2007): Mykologische und epidemiologische Untersuchungen des Pathosystems *Mycosphaerella anethi* - Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Dissertation Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (http://www.tib.uni-hannover.de/spezielsammlungen/dissertationen/hannover/uebersichten/GGTSPU-styx.bba.de-31744-2017701-DAT/diss_07.pdf)

1.3 Anlage und Auswertung von Feldversuchen

1.3.1 Einleitung

Zur Kontrolle der Aussagekraft der im Labor ermittelten Daten wurden von 2009 bis 2011 vergleichende Feldversuche (Isolierungspartellen mit Maistrennstreifen) (Abb. 54 und 55) am JKI Quedlinburg (QLB) und DLRG Rheinpfalz in Klein-Altendorf (KAD) angelegt. Mit den Versuchen sollte die epidemische Entwicklung des Erregers unter natürlichen Witterungsverhältnissen im Hochsommer erfasst und verglichen werden. In erster Linie sollten die Beziehungen zwischen der Höhe des Ausgangsbefalls des Saatgutes und der epidemischen Befallsentwicklung im Hochsommer sowie zwischen der Anfälligkeit der Prüfglieder unter gleichen Vegetationsbedingungen und dem Befallsniveau des Erntegutes aufgeklärt werden.

1.3.2 Material und Methoden

Von den Projektpartnern wurden im Jahr 2009 24 Fenchelsorten und -herkünfte mit unterschiedlichem Ausgangsbefall (nach Sichtbonitur des Ernteguts) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden im folgenden Jahr noch zwei Sorten aus Bulgarien („Fenix“ und „Shumen“) in das Sortiment aufgenommen, die nach Literaturangaben (RAEV et al. 1982) wenig anfällig bzw. resistent gegenüber dem Erregerbefall sein sollten (Tab. 4). Neben der Untersuchung der Sortenanfälligkeit, sollte bei zwei Varianten der Einfluss der Sekundärinfektionen durch Konidienflug im Fenchelbestand im Vergleich zur Fruchtvorinfektion ermittelt werden. Dazu wurden je zwei Saatgutproben (eine Probe mit wenig = „Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A und 6A“; und je eine mit stärkerem Befall = „Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B“ „Mix Berfena (Agri) 6B“) abwechselnd in die Saatlöcher gegeben. Die Bonitur der Pflanzenvarianten erfolgte getrennt. Die zwei Versuche in KAD zeigten keine Befallsunterschiede zwischen diesen Varianten, daher wurden sie gemeinsam bewertet (Bezeichnung: „Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Alsbach (KB 09) 5“ und „Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Berfena (Agri) 6“.

Tab. 4: Verwendetes Saatgut für die dreijährigen Feldversuche an zwei Standorten.

Nr.	Probenbezeichnung	Bemerkungen	Firma
1	Berfena (Agri) A1		Dr. Schubert, agrimed
2	Magnafena (Agri) A2		Dr. Schubert, agrimed
3	Großfrüchtiger 89223 (N.L.C.) A3		N.L. Chrestensen Samenzucht
4	Bulgare (N.L.C.) A4	Süßfenchel (Spreader)	N.L. Chrestensen Samenzucht
5	Berfena 89218 (N.L.C.) A5		N.L. Chrestensen Samenzucht
6	Großfrüchtiger 79061 (N.L.C.) A6		N.L. Chrestensen Samenzucht
7	Berfena 79134 (N.L.C.) A7		N.L. Chrestensen Samenzucht
8	Finocchio Selvatico (K.T.) A8	Wildfenchel bzw. Knollenfenchel	Franchi, Dr. Taubenrauch
9	Berfena LP (M.B.) A9	„Berfena“ „La Paz“ Chile; ohne Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
10	Berfena U1 (M.B.) A10	„Berfena“ Ungarn; mittlerer Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
11	Fenchel OL (K.T.) A11	Oldenburger Fenchel 08, Wildsammlung	Dr. Taubenrauch, JKI
12	Soroksari U1 (M.B.) A12	„Soroksari“ Ungarn; starker Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
13	Berfena U2 (M.B.) A13	„Berfena“ Ungarn;	Martin Bauer GmbH & Co. KG

		starker Befall	
14	JKI 1 524-01 (JKI) A14		Dr. Marthe, JKI
15	Berfena SC (M.B.) A15	„Berfena“, Sta. Carolina, Chile; ohne Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
16	Soroksari U2 (M.B.) A16	„Soroksari“ Ungarn; mittlerer Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
17	JKI 2 524-02 (JKI) A17		Dr. Marthe, JKI
18	Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) A18	Ostasiatischer Ursprung, China 2007, ohne Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
19	JKI 3 524-03 (JKI) A19		Dr. Marthe, JKI
20	Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20	Ostasiatischer Ursprung, China 2008, ohne Befall	Martin Bauer GmbH & Co. KG
21	SOK07 Linie (Pharm.) A37		Dr. Plescher, Pharmaplant Artern
22	SOK06 Linie (Pharm.) A38		Dr. Plescher, Pharmaplant Artern
23	SOW06 Linie (Pharm.) A39		Dr. Plescher, Pharmaplant Artern
24	SOW05 Linie (Pharm.) A40		Dr. Plescher, Pharmaplant Artern
25	Fenix (Todo Bul) 1		Dr. Todorova, Bulgarischer Kräuterverband
26	Shumen (Todo Bul) 2		Dr. Todorova, Bulgarischer Kräuterverband

Da noch kein einheitliches Bewertungsschema für den Fruchtbefall existierte, sollte die hohe Anzahl der Prüfglieder eine möglichst breite Befallsspanne des Ausgangsaatgutes garantieren, um deutlich erkennbare Unterschiede in der Befallsentwicklung bonitieren zu können. Die Voreinschätzungen des Befallsgrades der Früchte wurden von den Firmen abgegeben, die das Saatgut zur Verfügung stellten.

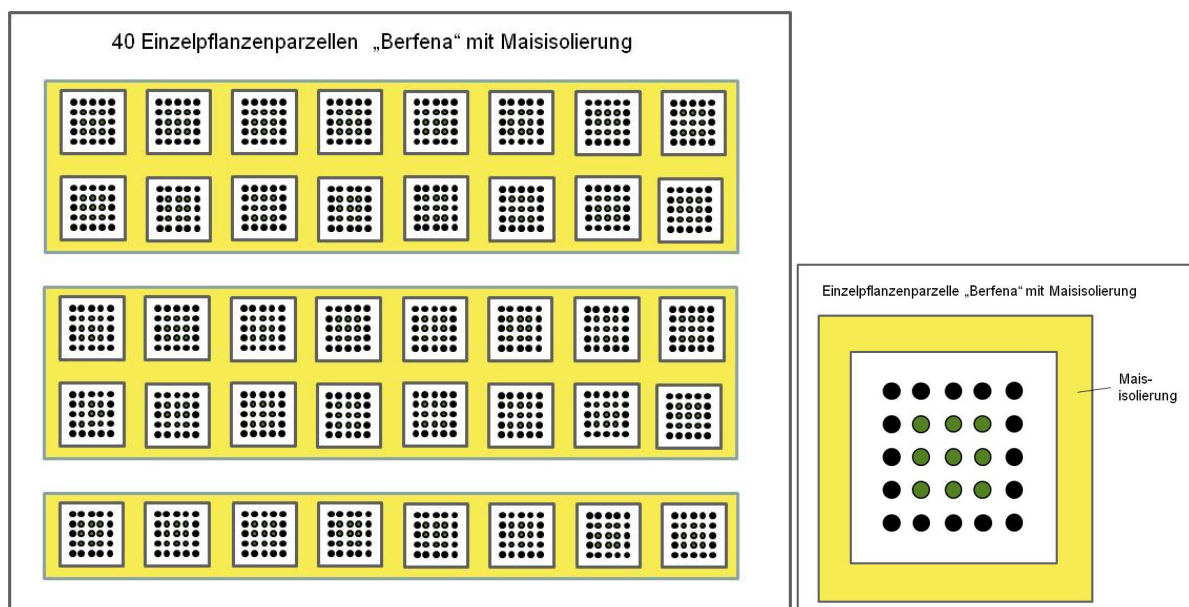


Abb. 54: Feldversuchsanlage (Übersichtsplan (links) und Ansicht einer Einzelparzelle (rechts) mit je 25 Einzelpflanzstellen) zur Erfassung des epidemischen Befallsverlaufs von *M. anethi* an Fenchelakzessionen.



Abb. 55: Übersichtsaufnahme des Fenchelversuchsfelds Mitte Mai (oben); Einzelparzelle Mitte Juni und Ende August.

Die Einzelparzellen bestanden aus je 25 Einzelpflanzenstellen, die Ende März mit dem Legestock ausgesät worden waren. Zur Verhinderung des Konidienflugs zwischen den Varianten wurden Maisisolierungsstreifen zwischen den Parzellen angelegt (Abb. 54 und 55). Der Pflanzenabstand bei Fenchel betrug 0,6 m innerhalb und zwischen den Reihen. Der epidemische Befall wurde wöchentlich über 15 Wochen ab Ende Juli anhand der durch den *M. anethi*-Befall abgestorbenen Blätter des Haupttriebs erfasst. Die Verrechnung erfolgte mit einem speziellen Bonitursystem (Tab. 5), das für das Pathosystem bereits früher entwickelt worden war. Anhand vorliegender Werte aus der Befallsermittlung mit einer Farbprofilsoftware („Bafix“, GTA-Sensorik, Neubrandenburg), bei der die Blattsymptome von *M. anethi* auf Einzelblättern quantifiziert werden konnten, wurde ein Boniturwert empirisch festgelegt.

Dieser Wert wurde für jedes Befallsstadium der Pflanze anhand der Anzahl der durch den Erregerbefall abgestorbenen Blätter bestimmt (Tab. 5). Für mittelhohe und hohe Sorten wurde jeweils ein eigenständiges System entwickelt und angewendet. Die Befallsverrechnung erfolgte daher unter Berücksichtigung der Blattmasse und der Wuchshöhe. Pro Parzelle wurden je 9 Pflanzen bewertet.

Um den Befallsverlauf über die gesamte Boniturzeit vergleichen zu können, wurde aus den Einzelbefallswerten für jede Pflanze einer Variante die Fläche unter der Befallskurve (AUDPC) ermittelt. Die Varianzanalyse erfolgte mit dem Programm SAS System Release 9.3 nach Variante, Wiederholung und Befallswert. Zur Ermittlung signifikanter Befallsunterschiede wurde der Tukey Grouping Test verwendet.

Zusätzlich wurde der Doldenstielbefall (je 10 Dolden pro Parzelle, Bonitur Anfang November), die Doldenabreife (je 10 Dolden pro Parzelle, Bonitur Anfang November) (je 10 Dolden, Bonitur Anfang November) und der Fruchtbefall (Sichtbonitur und PTA-ELISA; siehe vorherige Kapitel) der Varianten ermittelt. Im Jahr 2009 wurden die Varianten nur in ein bzw. zwei Wiederholungen angebaut, eine Ertragsverrechnung war aus diesem Grund nicht aussagekräftig. Zusätzlich erschwerte die späte Abreife einzelner Varianten eine präzise Erfassung des Ertrags. Im Jahr 2010 wurde an beiden Standorten der Ertrag von je 9 Pflanzen erfasst. Im Jahr 2011 verhinderte ein starker Hagelschaden am Standort QLB die Ernte und Ertragsverrechnung.

Tab. 5: Empirisch ermittelte Boniturwerte für mittelhohe (14 Blätter) und hohe (16 Blätter) Fenchelsorten zur Schaderfassung von *M. anethi*-Befall an der Pflanze (%). Die Anzahl der abgestorbenen Blätter wird durch den zugeordneten Boniturwert für den prozentualen Pflanzenbefall ersetzt. Zur Wertanpassung werden zwei Termine T01 und 02 vor dem ersten Blattverlust eingerechnet, sie repräsentieren die ersten Blattschäden vor dem epidemischen Befallsausbruch.

Pflanzentyp / Bonitur	Anzahl abgestorbener Blätter am Haupttrieb																	
	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
mittelhohe Pflanzen (14 Blätter)	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Boniturwert (%)	4,64	7,50	19,9	32,2	51,0	65,4	76,1	86,8	84,5	93,8	95,1	98,6	96,0	100,5	97,1	100,0		
hohe Pflanzen (16 Blätter)	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Boniturwert (%)	4,1	6,6	9,7	17,9	35,1	43,8	57,7	68,3	79,7	88,4	90,2	94,5	94,2	100,6	101,8	101,1	98,6	100,0

1.3.3 Ergebnisse

1.3.3.1 Feldversuche QLB und KAD 2009

1.3.3.1.1 Feldversuch QLB 2009

1.3.3.1.1.1 Epidemische Befallsentwicklung

Im ersten Jahr wurden 24 Fenchelsorten und -herkünfte getestet. Je nach Menge des zur Verfügung gestellten Saatgutes wurden die Varianten in einer oder zwei Wiederholungen in Maisisolierungsparzellen angebaut. Zur Bonitur standen daher 9 bzw. 18 Einzelpflanzen zur Verfügung, die über 15 Wochen bonitiert wurden (Abb. 56).

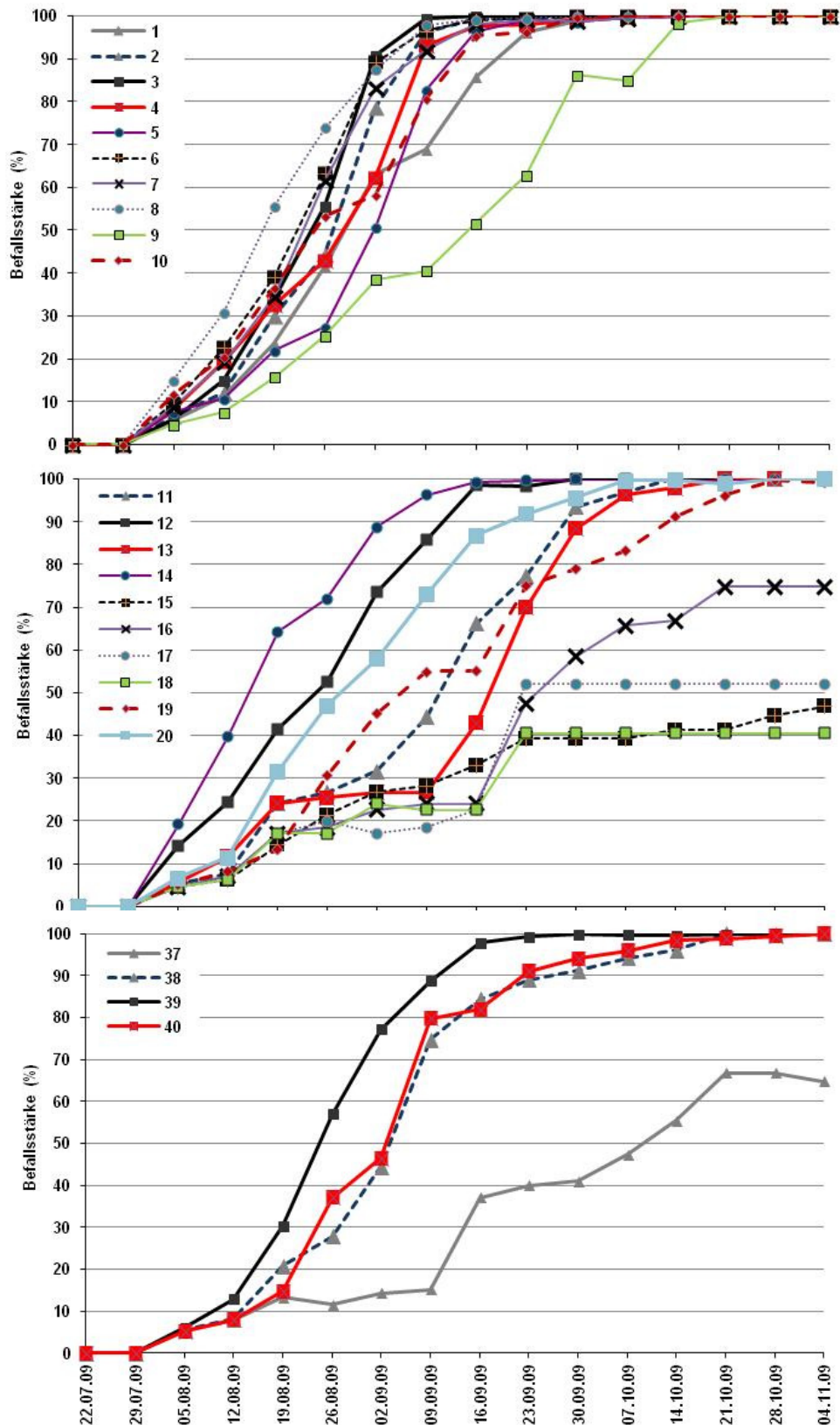


Abb. 56: Befallskurven (durch *M. anethi* befallene Blattfläche in %) der 24 Varianten des Feldversuchs 2009. **Variantenbezeichnung** : 1: ‚Berfena (Agri) A1‘; 2: ‚Magnafena‘ (Agri) A2‘; 3: ‚Großfrüchtiger 89223 (N.L.C.) A3‘; 4: ‚Bulgare (N.L.C.) A4‘; 5: ‚Berfena 89218 (N.L.C.) A5‘; 6: ‚Großfrüchtiger 79061 (N.L.C.) A6‘; 7: ‚Berfena 79134 (N.L.C.) A7‘; 8: ‚Finocchio Selvatico (K.T.) A8‘; 9: ‚Berfena LP (M.B.) A9‘; 10: ‚Berfena U1 (M.B.) A10‘; 11: ‚Fenchel OL (K.T.) A11‘; 12: ‚Soroksari U1 (M.B.) A12‘; 13: ‚Berfena U2 (M.B.) A13‘; 14: ‚JKI 1 524-01 (JKI) A14‘; 15: ‚Berfena SC (M.B.) A15‘;

16: ‚Soroksari U2 (M.B.) A16‘; 17: ‚JKI 2 524-02 (JKI) A17‘; 18: ‚Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) A18‘; 19: ‚JKI 3 524-03 (JKI) A19‘; 20: ‚Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20‘; 37: ‚SOK07 Linie (Pharm.) A37‘; 38: ‚SOK06 Linie (Pharm.) A38‘; 39: ‚SOW06 Linie (Pharm.) A39‘; 40: ‚SOW05 Linie (Pharm.) A40‘.

Die epidemische Befallsentwicklung (Abb. 56) verlief an den Varianten unterschiedlich schnell. Die ‚Berfena‘-Herkünfte zeigten einen rascheren Befallsverlauf mit wöchentlich zunehmenden Blattschädigungen. ‚Bulgare JKI 1‘ und zwei Herkünfte ‚Ostasiatischer Ursprung‘ waren niedrigwüchsig, was zu starken und schnellen Absterbeerscheinungen der Blätter führte.

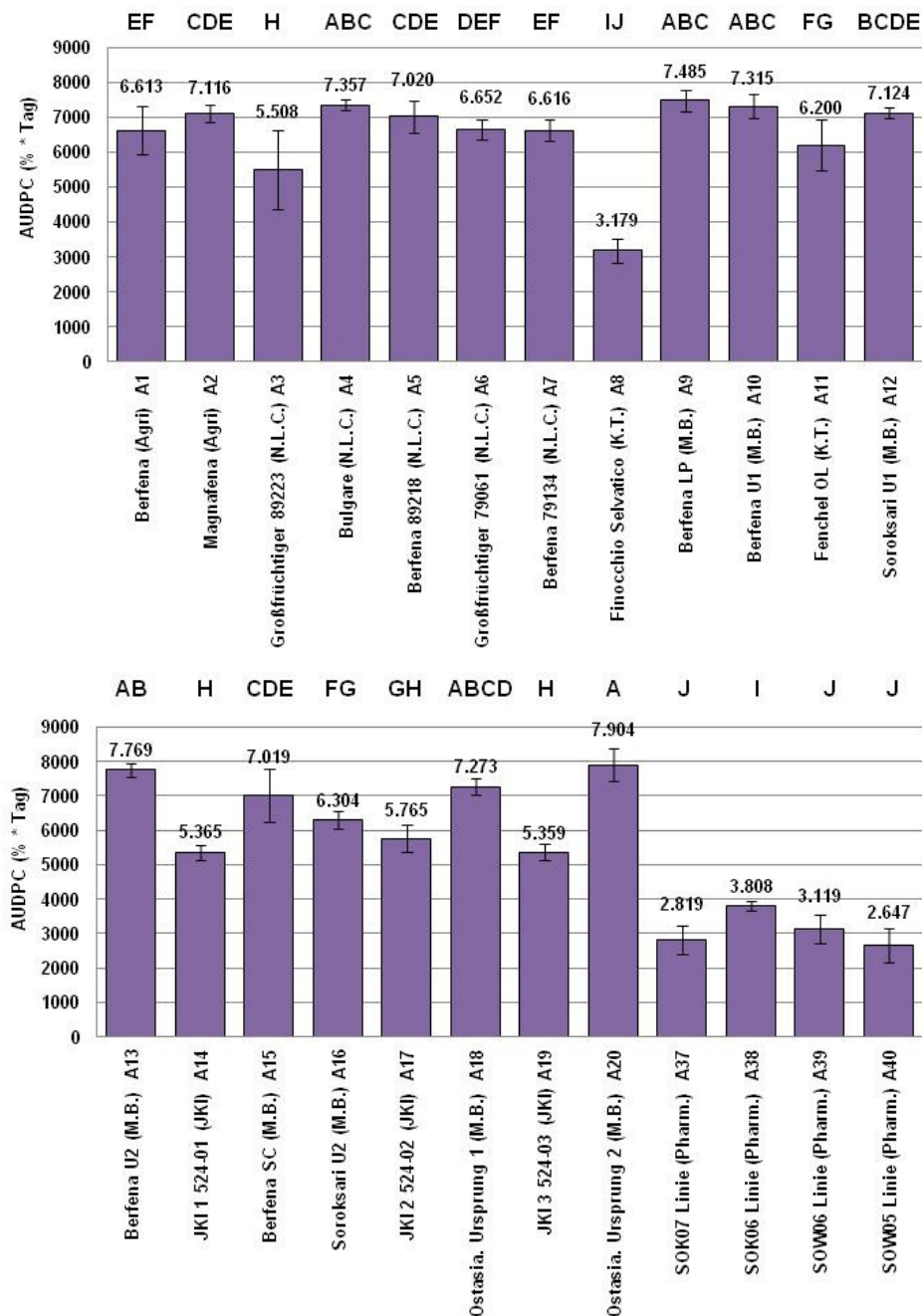


Abb. 57: Vergleich der 24 Varianten des Feldversuches 2009 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

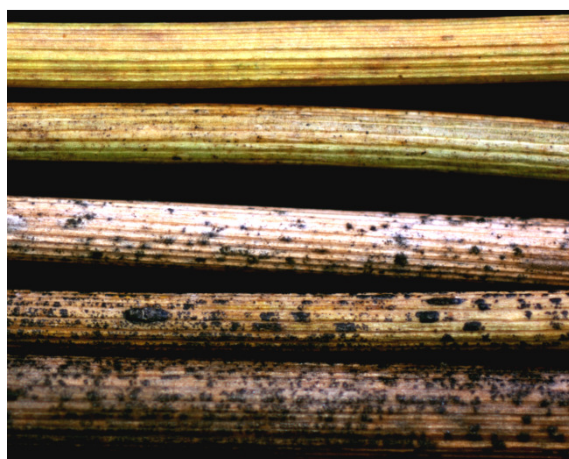
Diese Varianten zeigten Mitte September einen starken Doldenbefall mit großen Mengen an weiß sporulierenden Konidienlagern. Die Herkünfte 37 - 40 (SOK07, SOK06, SOW06, SOW05 Linien) waren dagegen extrem spätreifend (Blütezeit Anfang November). Der *M. anethi*-Befall trat bei ihnen nicht epidemisch auf, sondern nur in Form zahlreicher Pusteln auf den Blättern. Die Blattschädigungen waren daher nur eingeschränkt und verzögert zu bonitieren. Die Pflanzen waren bis zum Frost überwiegend grün.

Der AUDPC-Wert (Abb. 57) war bei ‚Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20‘ signifikant am höchsten, gefolgt von ‚Berfena U2 (M.B.) A13‘, ‚Berfena LP (M.B.) A9‘, ‚Bulgare (N.L.C.) A4‘ und ‚Berfena U1 (M.B.) A10‘. Am wenigsten anfällig waren ‚SOW05 Linie (Pharm.) A40‘, ‚SOK07 Linie (Pharm.) A37‘, ‚SOW06 Linie (Pharm.) A39‘, ‚Finocchio Selvatico (K.T.) A8‘ und ‚SOK06 Linie (Pharm.) A38‘. Die Herkünfte ‚Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) A18‘, ‚Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20‘ und ‚Berfena LP (M.B.) A9‘ sollten nach Voreinschätzung der Projektpartner keinen bzw. geringen Befall auf den Früchten aufweisen und sich im bisherigen Anbau als gering befallen gezeigt haben. Im Vergleichsanbau 2009 zeigten sie schnelle und rasche Epidemieverläufe mit starken Blattschädigungen.

Sorten mit starkem Ausgangsbefall der Früchte, wie ‚Berfena U2 (M.B.) A13‘ und ‚Bulgare (N.L.C.) A4‘, waren ebenfalls sehr anfällig mit signifikant hohen Werten.

1.3.3.1.1.2 Doldenstielbefall und Abreife

Das Ausgangssortenspektrum erwies sich im Feldversuch 2009 als sehr divers bezüglich der Reifezeit und der Befallsentwicklung. Einige Fenchelherkünfte waren sehr klein- bzw. hochwüchsig, andere wiesen einen besonders starken Verzweigungsgrad und sehr kleine Dolden auf. Die unterschiedlich lange Entwicklungszeit bis zur Blüte war für den epidemischen *M. anethi*-Befallsausbruch besonders bedeutsam. Mit dem Blühbeginn traten die ersten *M. anethi*-Befallsymptome auf den untersten Blättern auf. Die Epidemie entwickelte sich sehr rasch, sodass hier eine wöchentliche Befallszunahme bonitiert werden konnte (siehe Abb. 53). Die Symptome von *M. anethi* wurden an den Doldenstielen besonders deutlich (Boniturschema siehe Abb. 58), daher wurden je 10 Dolden pro Parzelle (gleiches Entwicklungsstadium) und Variante bonitiert.



1 = Doldenstiel ohne sichtbaren Befall

3 = wenige vereinzelte Konidienlager

5 = zahlreiche Konidienlager

7 = zahlreiche kleine und große Konidienlager

9 = sehr viele große ausgedehnte Konidienlager

Abb. 58: *M. anethi*-Boniturschema zur Doldenstielbefallseinschätzung (Boniturnote 1 - 9).

Einige Sorten bzw. Herkünfte kamen erst im Oktober zur Blüte, hier konnte keine epidemische Entwicklung von *M. anethi* bonitiert werden. Es traten lediglich vereinzelte Konidienlager an den Blättern auf, Absterbeerscheinungen unterblieben.

'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) A18' und 'Bulgare (N.L.C.) A4' waren sehr frühabreifend und zeigten die stärksten Doldenstielsymptome, beides waren niedrige Akzessionen. 'Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20' war etwas später abreifend und auch etwas geringer befallen (Abb. 59).

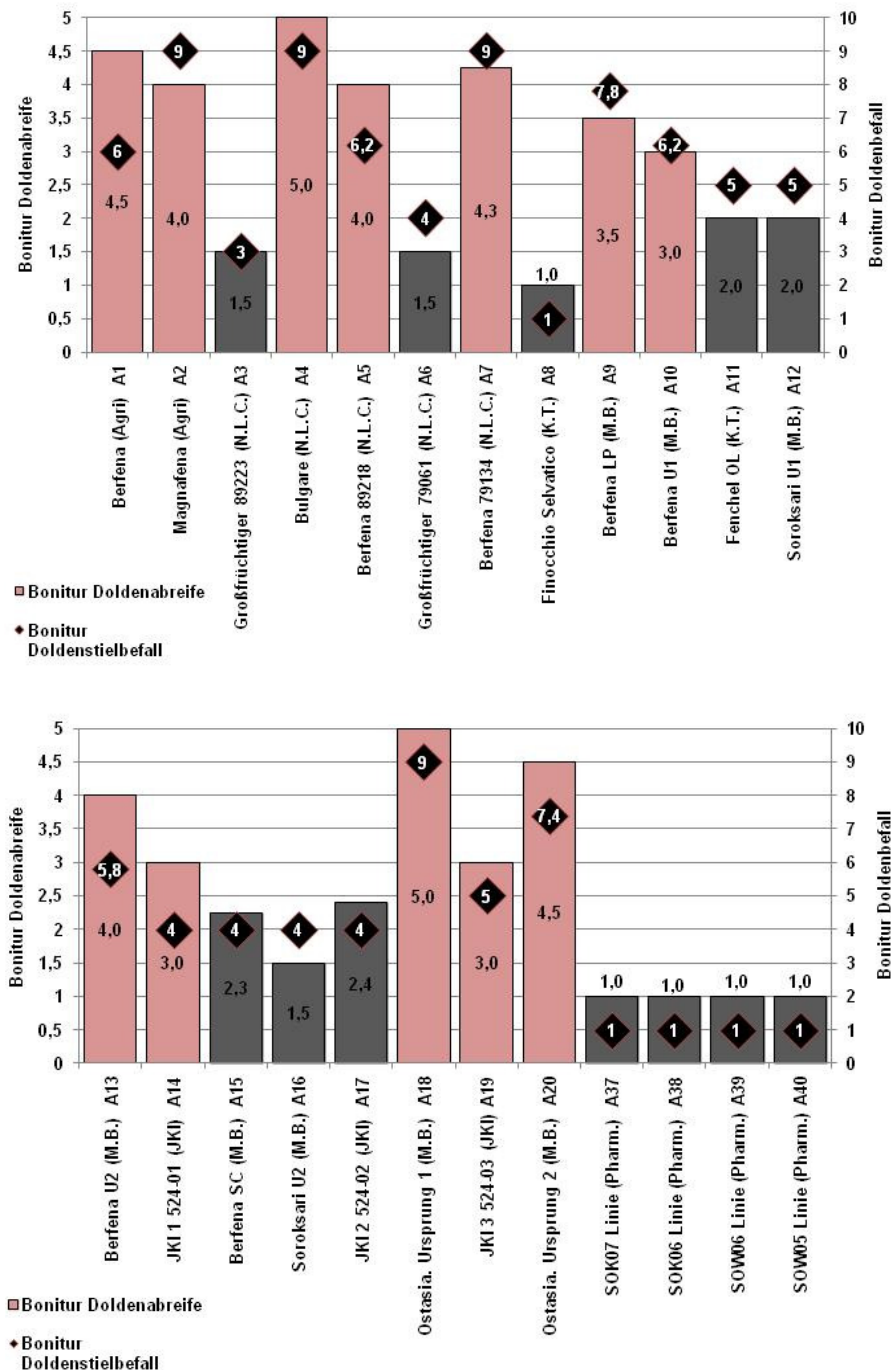


Abb. 59: Zusammenhang zwischen Doldenabreife (Säulen) und Doldenbefall (Raute) von 24 Sorten und Herkünften des Feldversuchs 2009. **Doldenabreifestadium** (Anfang November): Boniturnoten: 1 = Doldereife bei einigen Primärdolden, 2 = alle Primärdolden abgereift, 3 = Dolden überwiegend abgereift, 4 = alle Dolden braun, Stängel noch grün, 5 = alle Dolden und obere Stängel braun, erster Samenausfall. **Doldenstielbefallssymptome:** Boniturnote (1 - 9) des sichtbaren *M. anethi*-Befalls.

Die Hochleistungssorten ‚Berfena‘ und ‚Magnafena‘ waren mit ihrer Hauptblütezeit im August noch recht frühzeitig, der exakte Termin variierte aber etwas. Ob es sich bei

diesen Sorten tatsächlich um sortenreine Varianten handelte, konnte nicht geklärt werden. Das Aussehen der Pflanzen (Wuchshöhe) und Farbe der Früchte war ebenfalls unterschiedlich. Die Parameter Doldenbefall und Symptomentwicklung waren signifikant korreliert ($r = 0,913$).

Die Ernte einzelner Primärdolden der spätreifenden Herkünfte war erst im November möglich, als bereits erste Fröste aufgetreten waren. Die erfolgreiche Ernte dieses Materials war daher unter unseren Klimabedingungen nicht immer gesichert.

Da spätabreifende Herkünfte von den Praxispartnern offensichtlich als weniger anfällig gegenüber dem Erregerbefall eingestuft wurden, ergab sich die Frage, ob die epidemische *M. anethi*-Befallsausbreitung in einem ursächlichen Zusammenhang mit stofflichen Veränderungen der Pflanze steht. Die bisherigen Untersuchungsergebnisse zeigten klar, dass die Ertragsausfälle hauptsächlich durch die Stärke und Anzahl der Sekundärinfektionen bestimmt werden. Diese wurden nach den bisherigen Erkenntnissen im hohen Maße von den Witterungsbedingungen im Sommer begünstigt. Pflanzen ohne epidemische Erregerverbreitung wiesen zwar vereinzelte Konidienlager auf, die Dolden waren nach Sichtbonitur aber kaum befallen.

Im Feld war der Erreger aber trotzdem an jeder einzelnen Pflanze zu finden, d. h. es kamen keine völlig unbefallenen Fenchelpflanzen vor. Möglicherweise wurden in den letzten Jahren immer die spätabreifenden Fencheltypen als weniger anfällig ausgewählt. In diesem Fall entstünde ein Konflikt mit den Züchtungszielen im Fenchelanbau, wo die frühe Abblüte und Reife ein wesentliches Merkmal moderner Sorten darstellt und die Ernte vor dem Frost garantiert.

1.3.3.1.1.3 Fruchtbefall

Der Befall des Ausgangssaatguts und die daraus hervorgegangene Ernte wurden sowohl mittels Sichtbonitur (siehe Fruchtbefallseinschätzung), als auch mit dem semi-quantitativen PTA-ELISA quantifiziert.

Für die Sichtbonitur wurden je 60 Früchte beurteilt (3 Wiederholungen von je 20 Früchten, 6 Befallsklassen mit Wertungsfaktor) und der prozentuale Befall im Vergleich zur am stärksten befallenen Variante („Berfena 79134 (N.L.C.) A7“) umgerechnet (Abb. 60). Die Auszählung der Früchte war äußerst arbeitsintensiv, da zahlreiche Doppelfrüchte in den Proben neben Einzelfrüchten vorkommen. Zusätzlich erschwert die gekrümmte Form der Früchte eine schnelle Bonitur erheblich. Aus diesem Grund wurden nur Stichproben quantifiziert, die den eigentlichen PTA-ELISA überprüfen sollten. Es handelt sich daher nicht um die tatsächlich befallene Fruchtoberfläche, sondern nur um einen Vergleichswert zur am stärksten befallenen Variante der vorhandenen Probenmuster. Diese Charge wurde nachfolgend als Standard beim ELISA genutzt, um auch hier die Befallswerte prozentual zu verrechnen. Für die serologische Quantifizierung wurden die Proben nach Testvorschrift aufbereitet, die Extinktionswerte im ELISA-Reader gemessen und die ermittelten Befallswerte prozentual umgerechnet (siehe Testablauf PTA-ELISA).

a) Sichtbonitur des Ausgangssaatgutes der Feldversuche 2009

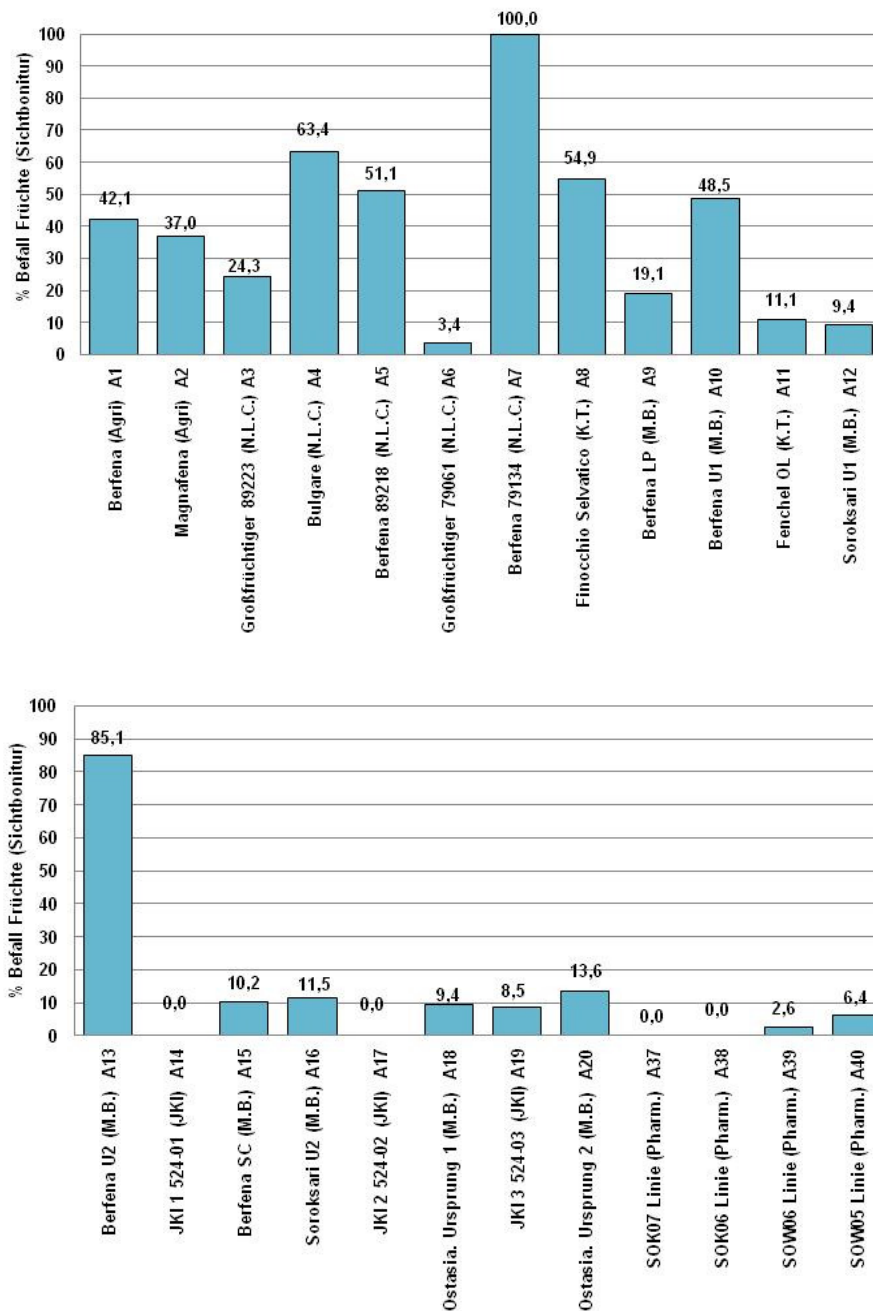


Abb. 60: Sichtbonitur der *M. anethi*-Befallssymptome der Fenchelfrüchte des Ausgangssaatgutes der Feldversuche 2009.

Die Varianten wiesen nach Sichtbonitur (Abb. 60) eine große Spannweite im Ausgangsbefall auf. Es wurde deutlich, dass ein Befall von 9 - 13 % offenbar in der Praxis als „nicht befallen“ gewertet wird. Die höher wüchsige Sorte ‚Soroksari‘ wurde zweimalig falsch eingeschätzt (9,4 % = stark befallen; 11,5 % = mittlerer Befall). Die Sorte ‚Berfena U2 (M.B.) A13‘ war nach ‚Berfena 79134 (N.L.C.) A7‘ am stärksten befallen, gefolgt von ‚Bulgare (N.L.C.) A4‘ und ‚Finocchio Selvatico (K.T.) A8‘. ‚Berfena‘-Varianten waren zwischen 19 % und 100 % infiziert, „Großfruchtiger“ 3,4 - 24,3 % und ‚Soroksari‘ zwischen 9,4 - 11,5 %. Beide Varianten ‚Ostasia. Ursprung‘ wiesen niedrige Werte auf (9,4 - 13,6 %). Die Voreinschätzung des Saatgutes war

daher richtig. Trotz der niedrigen Ausgangswerte zeigten sich diese Sorten im Vergleichsanbau als besonders anfällig, der Pilzbefall war sehr stark auf den Blättern und Dolden sichtbar.

b) PTA-ELISA Befallsbonitur des Ausgangssaatgutes der Feldversuche 2009

Die serologische Quantifizierung des Fruchtbefalls (Abb. 61) war mit den Werten der Sichtbonitur ($r = 0,609$) signifikant korreliert. Die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen waren bei einigen Proben recht hoch, die ELISA-Ergebnisse der Fruchtproben waren aber signifikant korreliert ($r = 0,975$).

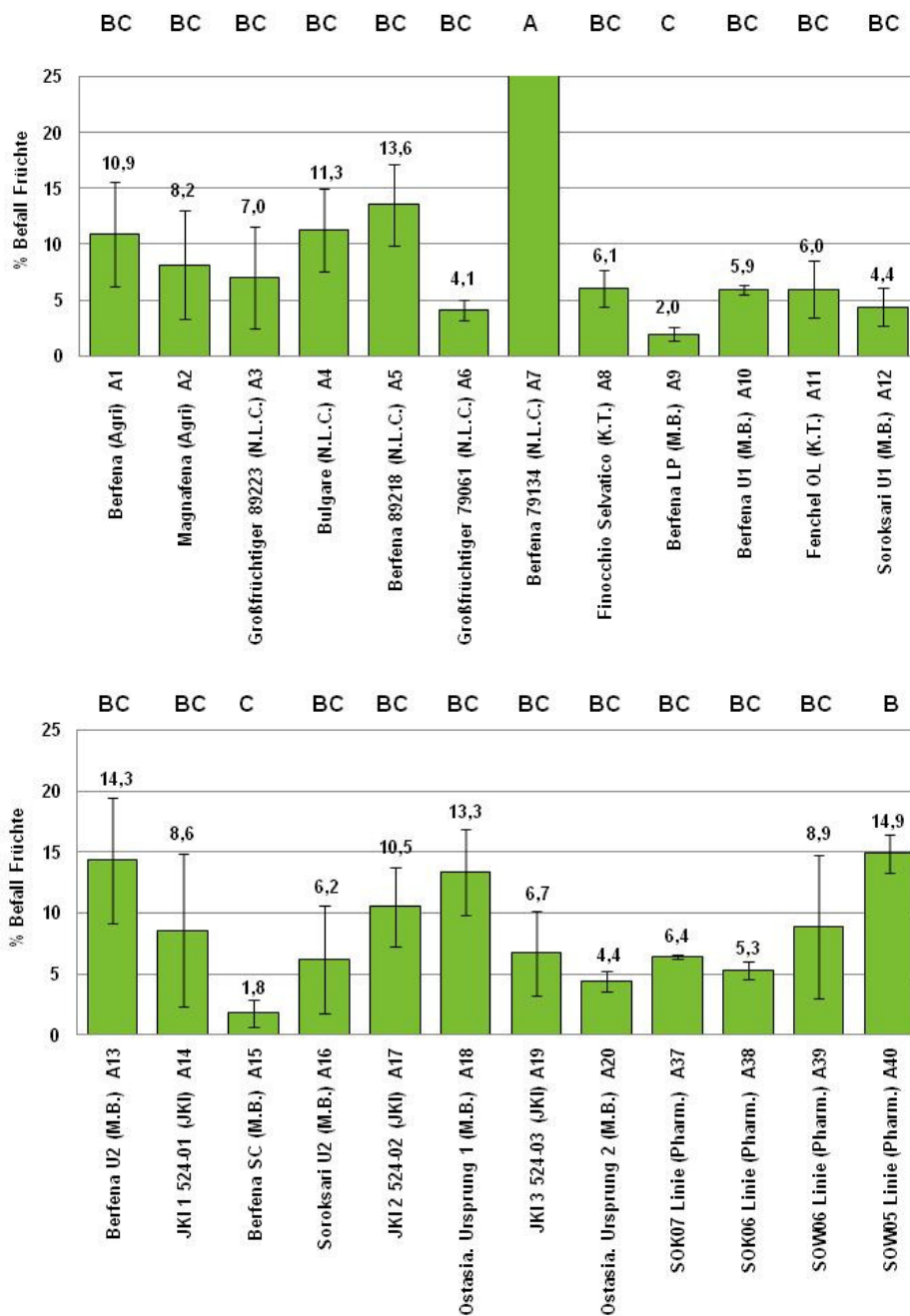


Abb. 61: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Fruchtbefalls des Ausgangssaatgutes der Feldversuche 2009.

Die Probe ‚Berfena 79134 (N.L.C.) A7‘ war wiederum am stärksten befallen, der Befallswert wurde für die prozentuale Verrechnung auf 100 % festgesetzt. Der zweithöchste Wert lag bei 14,9 %, der niedrigste bei 1,8 %, die Wertspanne war deutlich niedriger als bei der Sichtbonitur. Auffällig war, dass einige Proben, die in der Sichtbonitur kaum äußerliche Symptome zeigten, bei der serologischen Untersuchung vergleichsweise hohe Werte aufwiesen (z. B. SOW05 Linie (Pharm.) A40).

c) Sichtbonitur des Ernteguts des Feldversuchs

Die Sichtbonitur des Erntegutes (Abb. 62) wurde, im Gegensatz zu den Aussaatchargen, bei den Früchten aus allen Parzellen vorgenommen (1 bzw. 2 Wiederholungen).

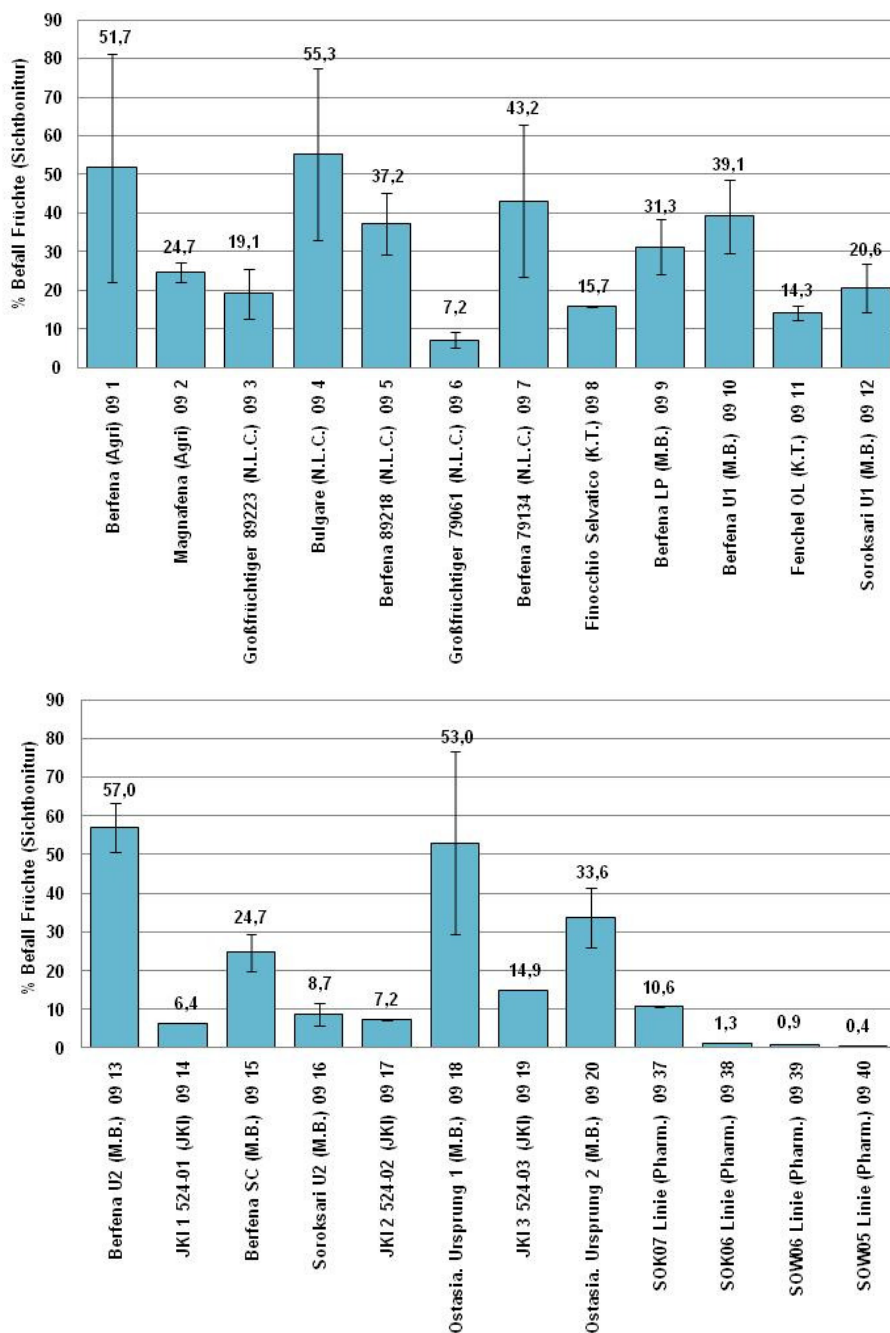


Abb. 62: Sichtbonitur der *M. anethi*-Befallssymptome der Fenchelfrüchte des Erntegutes des Feldversuchs QLB 2009.

Da bereits im Feldversuch größere Unterschiede im Befallsniveau der Einzelparzellen sichtbar wurden, zeigten sich diese Unterschiede auch deutlich in den höheren Standardabweichungen. Das Befallsniveau konnte, je nach Kleinklima der Parzelle und der Probenahme, sehr unterschiedlich hoch ausfallen. Die Befallswerte waren deutlich höher als vor der Aussaat. Gesicherte Aussagen über die Anfälligkeit der Sorten konnten daher nicht abgegeben werden. Einige Varianten waren aber deutlich weniger infiziert, vor allem die spätreifenden. Beide Sichtbonituren (Aussaat und Ernte) waren signifikant korreliert ($r = 0,713$).

Beide Herkünfte ‚Ostasia. Ursprung‘ und ‚Bulgare (N.L.C.) A4‘ waren vergleichsweise weniger stark befallen, wie aus den Feldversuchsbonituren zu erwarten gewesen wäre. Die Früchte wiesen zwar viele Symptome auf, die frühe Abreife der niedrigen Pflanzen verhinderte aber einen vorzeitigen Fruchtausfall. Das Erntegut war vollständig ausgereift und keimfähig.

d) PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

Die Sichtbonitur und die ELISA-Werte (Abb. 63) waren signifikant korreliert ($r = 0,820$), das serologische Wertniveau lag, wie bei der Sichtbonitur, ebenfalls deutlich höher als bei den Aussaatvarianten. Bei den höheren Befallswerten waren die Standardabweichungen wiederum recht hoch, trotzdem die ELISA-Ergebnisse untereinander signifikant korreliert ($r = 0,870$).

Der niedrigste Wert lag bei 15,3 % der Maximalwert bei 98,2 %. Die Variante ‚Berefena U2 (M.B.) A13‘ war auch in der Sichtbonitur besonders stark befallen. Bei den Varianten 39 - 40 (‚SOK06 Linie (Pharm.) A38‘; ‚SOW06 Linie (Pharm.) A39‘; ‚SOW05 Linie (Pharm.) A40‘), die sehr wenige Symptome aufwiesen, war ein vergleichsweise hoher Befallswert zu messen.

Die serologischen Aussaat- und Erntebefallswerte zeigten keinen rechnerischen Zusammenhang.

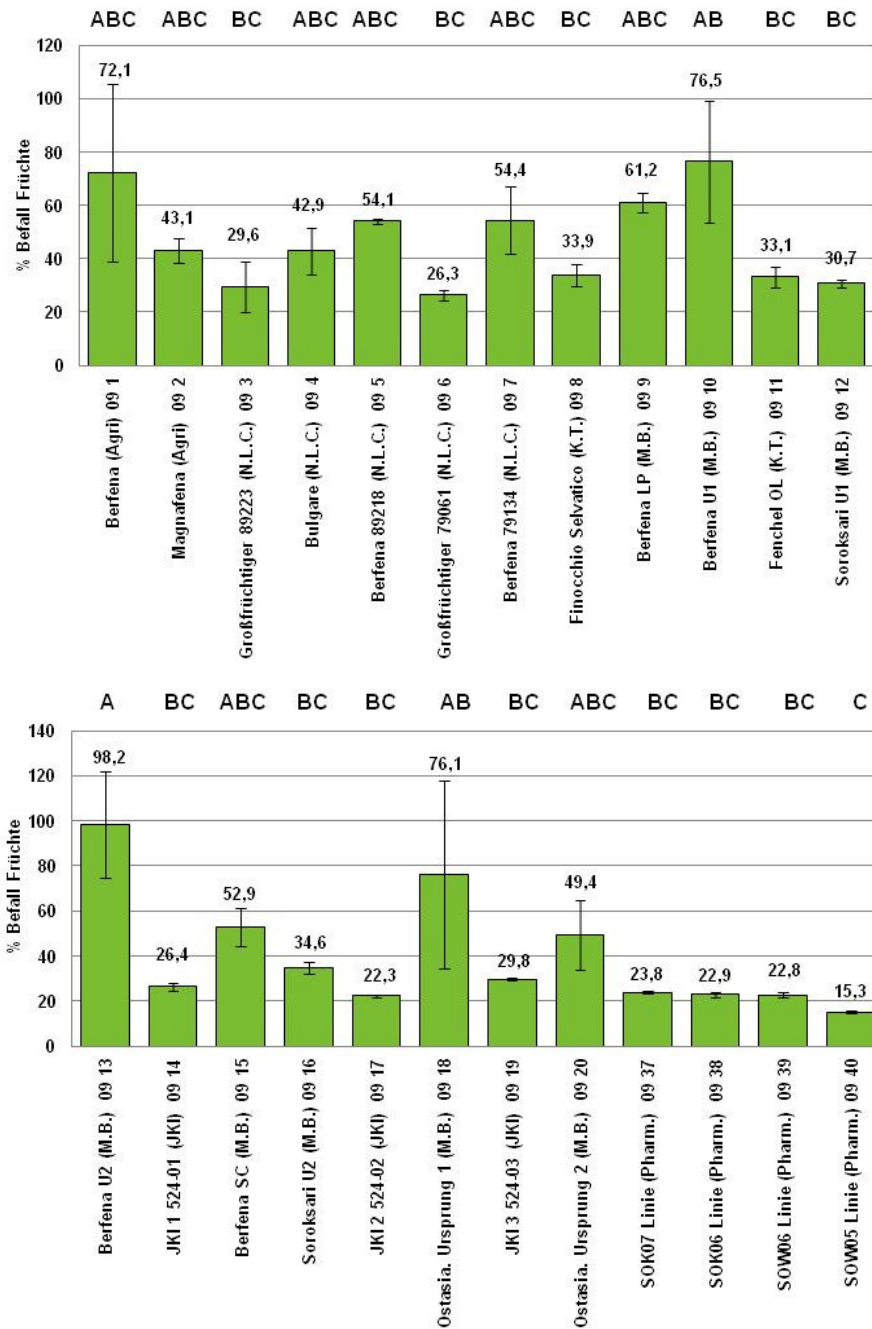


Abb. 63: Semi-quantitative PTA-ELISA-Befallsbonitur des Fruchtbefalls des Erntegutes des Feldversuchs QLB 2009.

1.3.3.1.2 Feldversuch KAD 2009

1.3.3.1.2.1 Epidemische Befallsentwicklung

Der Feldversuch 2009 wurde nach derselben Versuchsanlage und mit dem gleichen Saatgut angelegt wie der Versuch QLB 2009. Die wöchentlichen Befallsbonituren sollten ebenfalls über 15 Wochen durchgeführt werden. Da eine stärkere Symptombildung ausblieb und es nicht zu Blattverlusten infolge des Befalls kam, konnten die Schäden nicht mit dem Sichtbonitursystem quantifiziert werden.

Die Pflanzen hatten sich sehr gut entwickelt, sie waren sehr kräftig gewachsen und wiesen deutlich größere Blattflächen auf als am Standorte QLB. Die durchschnittliche Wuchshöhe betrug in KAD zwischen 0,8 - 2,00 m, in QLB nur 0,75 - 1,70 m. Im Hochsommer wurden lediglich einzelne Konidienlager an den Blättern gefunden.

Die Pflanzen waren Anfang November noch teilweise belaubt, an Früchten traten einzelne Symptome auf, ebenfalls kein stärkerer Befall (Abb. 64). Von den Feldversuchspartellen wurden Proben für die serologische Erregerquantifizierung genommen. In einer ersten Sichtbonitur wurden vereinzelt Konidienlager auf allen Früchten gefunden, größere Befallsflächen existierten nicht, die Doldenstrahlen waren überwiegend sauber.



Abb. 64: ‚Borfena (Agri) A1‘ Anfang November in KAD. Die Pflanzen wiesen noch eine Teilbelaubung auf, die Dolden zeigten nur sehr geringe Befallssymptome.

1.3.3.1.2.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

Die ELISA-Tests (Abb. 65) lieferten übereinstimmende Ergebnisse ($r = 0,809$). Das Wertniveau war überraschend hoch. Obwohl kaum Blattbefall auftrat war die Fruchtinfektion sehr stark. Die Standardabweichungen fielen hoch aus, bedingt durch die Unterschiede zwischen den Wiederholungen (Parzellen). ‚Magnafena (Agri) A2‘ war mit 44,2 % signifikant am stärksten befallen, ‚SOK07 Linie (Pharm.) A37‘, ‚SOW06 Linie (Pharm.) A39‘ und ‚SOW05 Linie (Pharm.) A40‘ am niedrigsten (2,3 - 2,6 %).

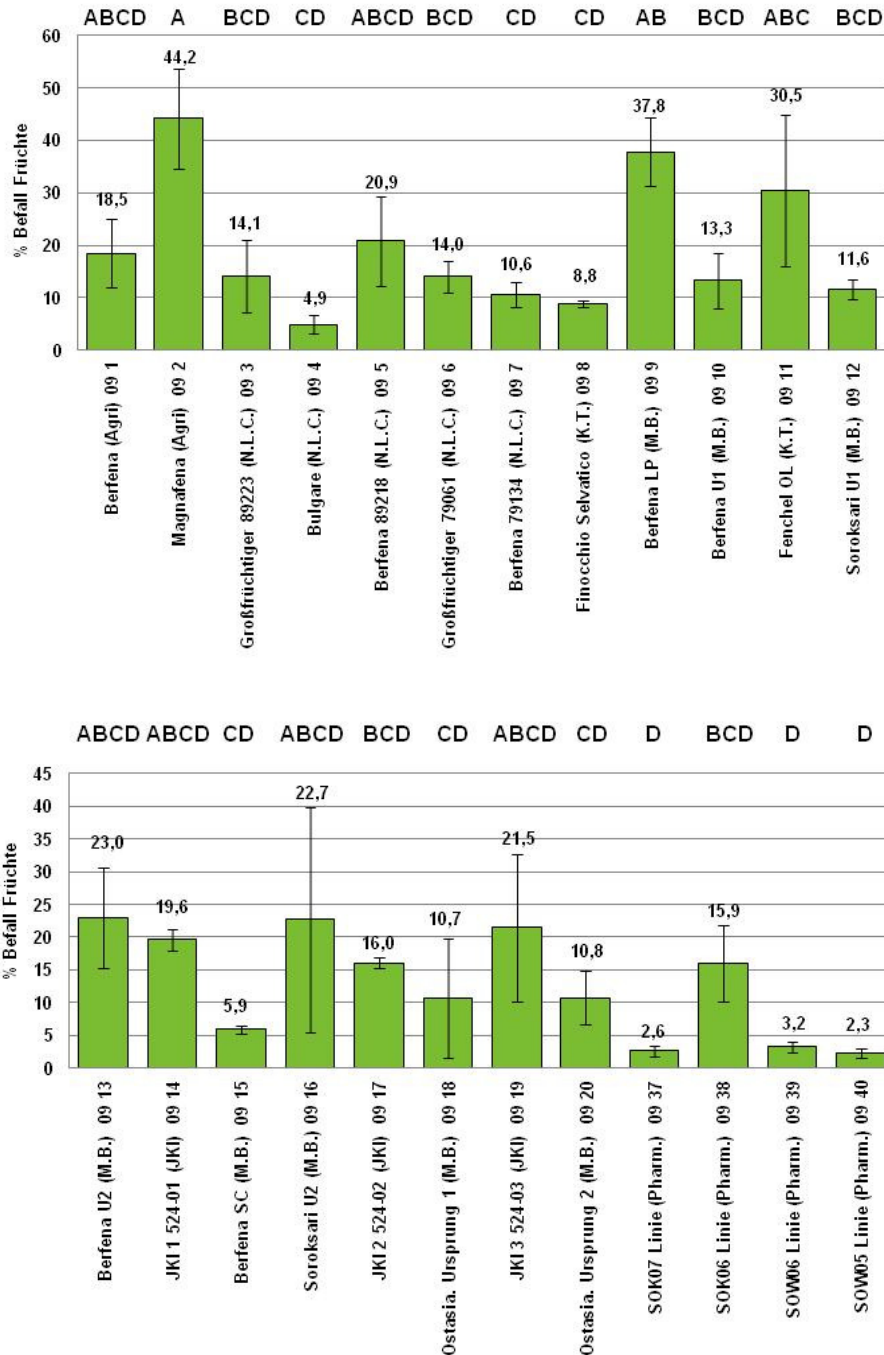


Abb. 65: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Fruchtbefalls des Erntegutes des Feldversuchs KAD 2009.

1.3.3.1.3 Fazit der Feldversuche QLB und KAD 2009

Das Ausgangssaatgut für die Feldversuche wurde mittels Sichtbonitur und serologisch quantifiziert. Beide Boniturmethoden lieferten übereinstimmende Ergebnisse ($r = 0,609$) über den Befallsgrad der Früchte, die aus sehr unterschiedlichem Anbau stammten. Einige Chargen kamen aus großflächigem Feldanbau (z. B. 'Berfena (Agri) A1'), die kleineren aus Kleinversuchen bzw. Einzelpflanzenvermehrung (SOK und SOW Linien). Das Befallsniveau war, ebenso wie der Blütezeitpunkt und der Ertrag, zum großen Teil sortenabhängig und nur teilweise durch die Art des Anbaus zu beeinflussen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass ein großflächiger Anbau den *M. anethi*-Befall verstärkt, wohingegen geringere Pflanzenanzahlen zu

geringeren Fruchtkontaminationen beitragen. Durch den erstmaligen gleichförmigen Anbau wurde ein Vergleich der Anfälligkeit unter gleichen Witterungsbedingungen möglich.

Das Erntegut in QLB wurde ebenfalls mit zwei Boniturmethoden beurteilt. Die Ergebnisse beider Methoden waren wiederum signifikant korreliert ($r = 0,878$).

In QLB bestand außerdem ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,713$) zwischen dem Befallsniveau des Ausgangssaatgutes und dem Erntegut (nach Sichtbonitur). Bei den ELISA-Werten war dies nicht der Fall. Die Befallswertverteilung in KAD zeigte keinen Zusammenhang mit der Vorkontamination des Ausgangssaatgutes.

Die Ergebnisse beider PTA-ELISA Untersuchungen der Früchte (QLB und KAD) waren miteinander signifikant korreliert ($r = 0,627$), die Varianten zeigten daher ein ähnliches Verhalten an beiden Standorten.

Bei Betrachtung der Befallsdifferenz (Ernte - Aussaat) (Abb. 66), d. h. der Veränderung des Befallsniveaus zwischen Aussaat und Ernte, zeigte sich, dass einige Sorten an den beiden Standorten recht ähnlich reagierten z. B. 'Magnafena (Agri) A2', 'Fenchel OL (K.T.) A11', 'JKI 1 524-01 (JKI) A14', 'Soroksari U2 (M.B.) A16', 'JKI 2 524-02 (JKI) A17', 'JKI 3 524-03 (JKI) A19' und 'SOK06 Linie (Pharm.) A38'. Sie waren möglicherweise nicht so stark von den Umwelteinflüssen betroffen, wie andere Sorten, zwischen denen sehr große Unterschiede auftraten z. B. 'Berfena (Agri) A1', 'Bulgare (N.L.C.) A4', 'Berfena U1 (M.B.) A10', 'Berfena U2 (M.B.) A13', 'Berfena SC (M.B.) A15', 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) A18' und 'Ostasia. Ursprung 2 (M.B.) A20'.

Das Sortiment des Anbaujahres unterschied sich daher stark in der Spannbreite des Befallsverhaltens. Der Grad der Infektion müsste daher durch Standortfaktoren zu beeinflussen sein.

In KAD war der Befall generell sehr viel niedriger als in QLB, sichtbar anhand der Befallswerte und auch bereits während der Bonituren auf dem Feld. Neben dem Befallsverlauf wurden die Witterungsbedingungen an beiden Standorten erfasst. Erste Vergleiche zeigten ähnliche Verhältnisse bezüglich der wichtigsten Parameter für die pilzlichen Neuinfektionen (Abb. 67). Nach unserer Erfahrung können Wind und ein Wechsel von feuchter und trockener Luft im Bestand den Infektionserfolg stark fördern. Umfänglich können die relevanten Witterungsfaktoren noch nicht bewertet werden. Aus diesem Grund müssen weiterführende Analysen erfolgen, um zunächst die Hauptparameter zu identifizieren, die eine epidemische Verbreitung stark beeinflussen.

Für das Pflanzenwachstum müssen aber auch die Bodenbedingungen genauer verglichen werden, da sie wahrscheinlich genauso bedeutsam sind.

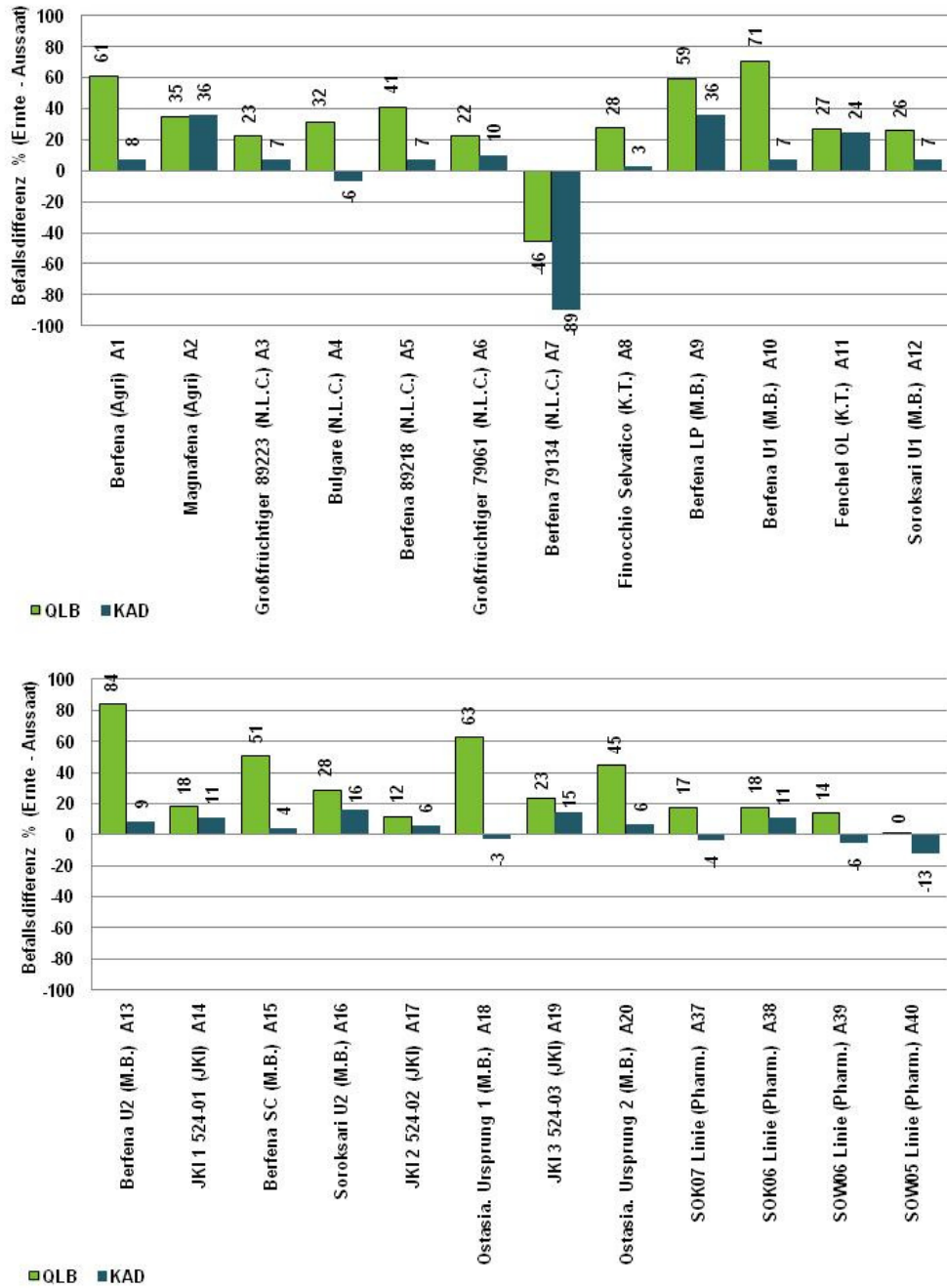


Abb. 66: Differenz zwischen Ausgangsbefall des Saatguts und Befall des Ernteguts anhand der PTA-ELISA-Quantifizierung der Früchte.

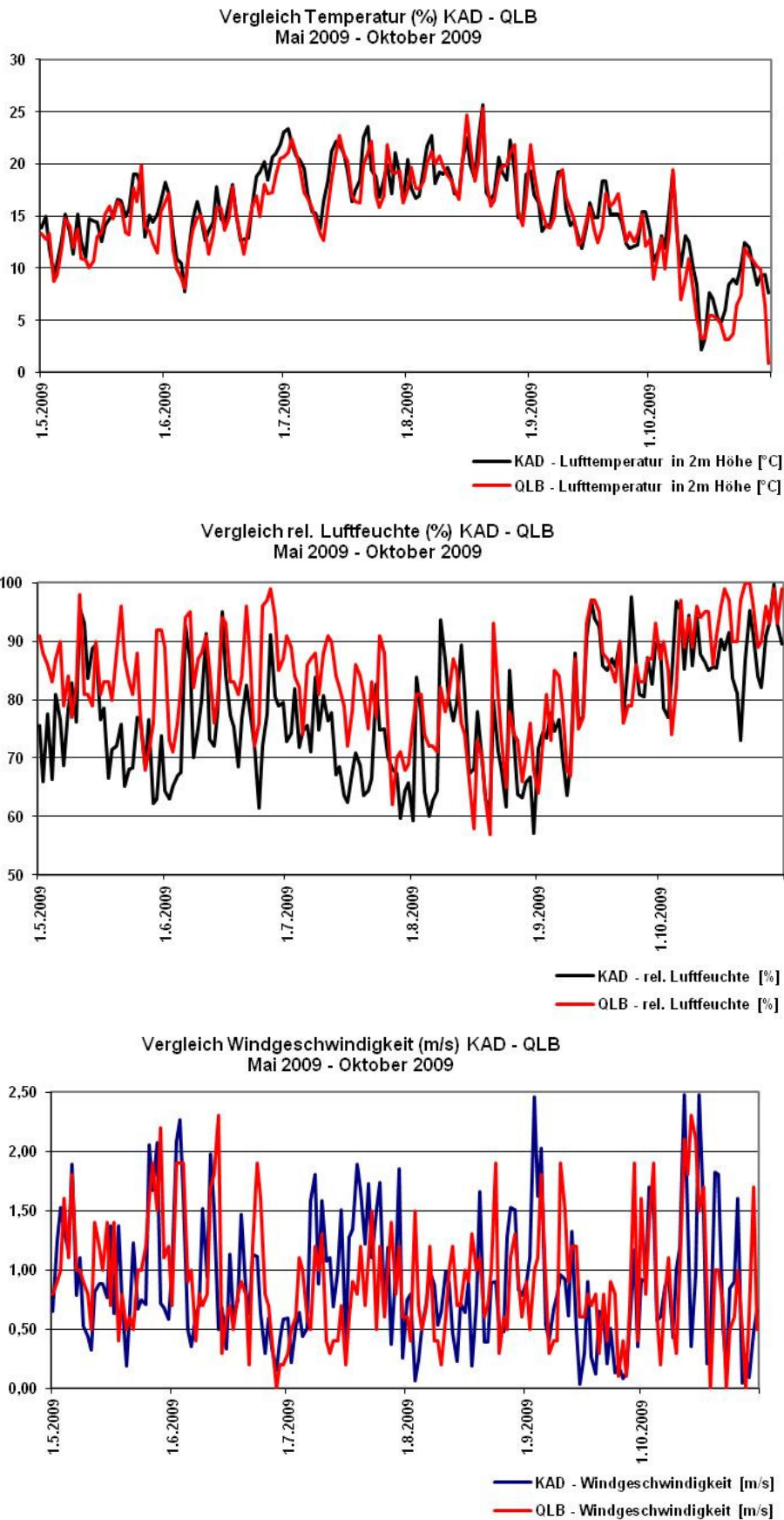


Abb. 67: Witterungsbedingungen in QLB und KAD 2009 (Luftfeuchte, Temperatur und Windgeschwindigkeit). (Grafiken: Kathrin Busch und Margit Dehe, DLR Rheinpfalz, Kompetenzzentrum Gartenbau).

Der Vergleich der Wertveränderungen (Abb. 68) zwischen der Aussaat und der Ernte der zwei Boniturmethoden am Standort QLB ergab keine rechnerische Übereinstimmung.

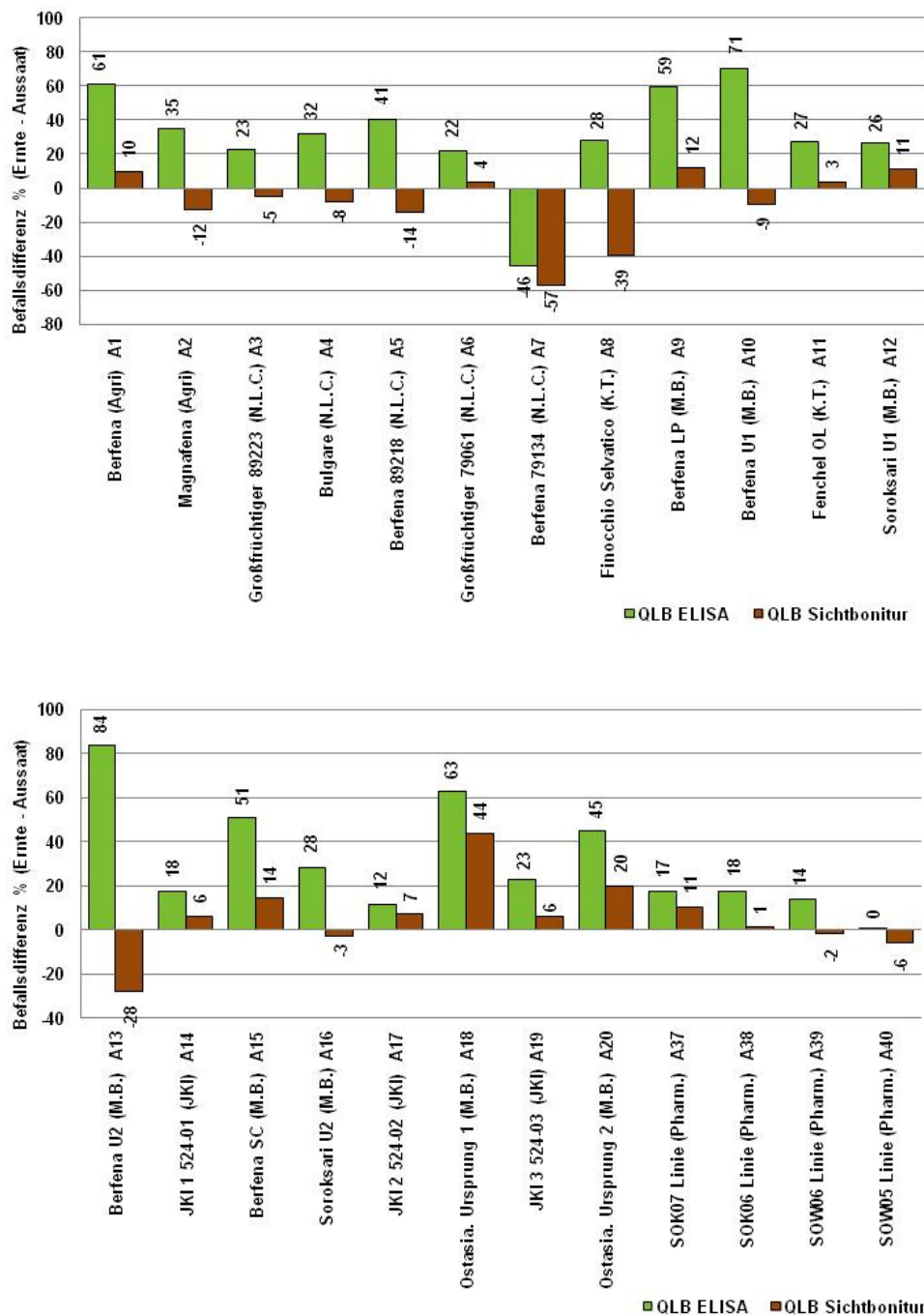


Abb. 68: Differenz zwischen Ausgangsbefall des Saatguts und dem Befall des Erntegutes anhand der PTA-ELISA Quantifizierung und der Sichtbonitur der Früchte am Standort QLB 2009.

Die Befallsdifferenzen ergaben bei der Sichtbonitur 11-mal eine Wertabnahme und 13-mal eine Zunahme des Befalls unter dem gemeinsamen Anbau. Bei der ELISA-Bonitur erfolgte 22-mal eine Wertzunahme. Beide Maßsysteme waren nicht direkt miteinander vergleichbar. Offenbar war die Einstufung mittels Sichtbonitur sehr viel ungenauer, weil nur die tatsächlich sichtbaren Symptome auf der Fruchthülle erfasst wurden. Das Mycel im Inneren des Gewebes wurde nicht berücksichtigt. Eine Sicht-

bonitur scheint für die Einschätzung der Pilzkontamination nur bedingt geeignet zu sein, bzw. müsste präzisiert werden, indem eine größere Anzahl von Wiederholungen eingerechnet würden.

Am Standort QLB bestand eine signifikante Korrelation zwischen AUDPC-Wert (Feldbefall) und dem PTA-ELISA ($r = 0,675$) sowie der Sichtbonitur des Erntegutes ($r = 0,703$).

Bei den Sichtbonituren bestand zwischen Ausgangssaatgut und Erntegut QLB eine signifikante Korrelation ($r = 0,713$).

Sichtbonitur und PTA-ELISA-Fruchtbefallswert waren in QLB jeweils signifikant korreliert (Aussaat $r = 0,609$; Ernte $0,878$). Es bestand keine Übereinstimmung zwischen dem Befallsniveau des Saatgutes und des Erntegutes nach den Ergebnissen der PTA-ELISA-Fruchtbonitur.

In KAD wurde keine Sichtbonitur durchgeführt, PTA-ELISA-Fruchtbefallswert von Aussaat und Ernte wiesen an diesem Standort keine Übereinstimmung auf.

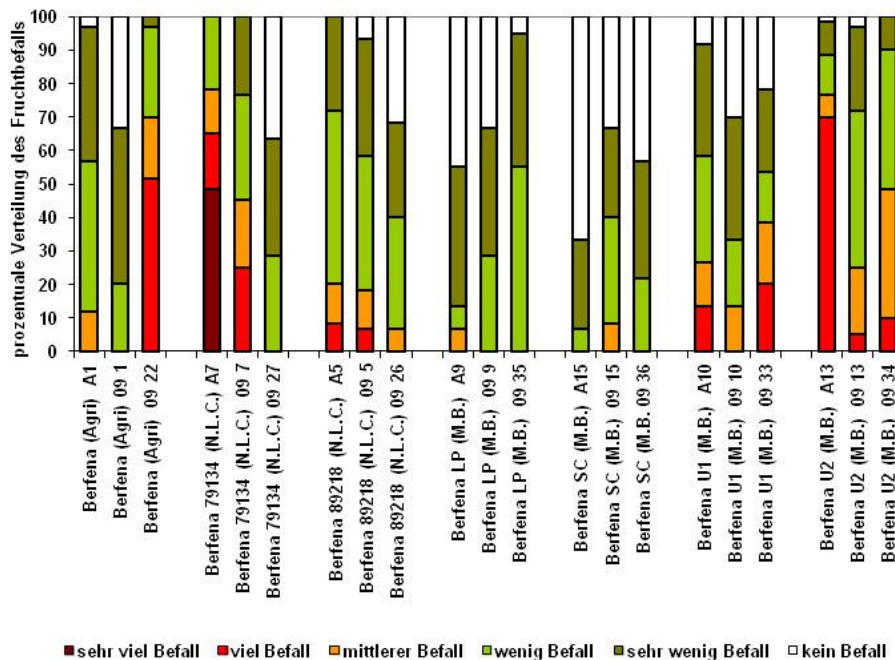


Abb. 69a: Sichtbonituren des Fruchtbefalls QLB 2009: Prozentuale Verteilung der 6 Befallsklassen der Früchte von Ausgangssaatgut (1.Säule einer Variante) und Erntegut (2. und 3. Wert = 1 – 2 Parzellen je Variante als Prüfglieder im Feldversuch).

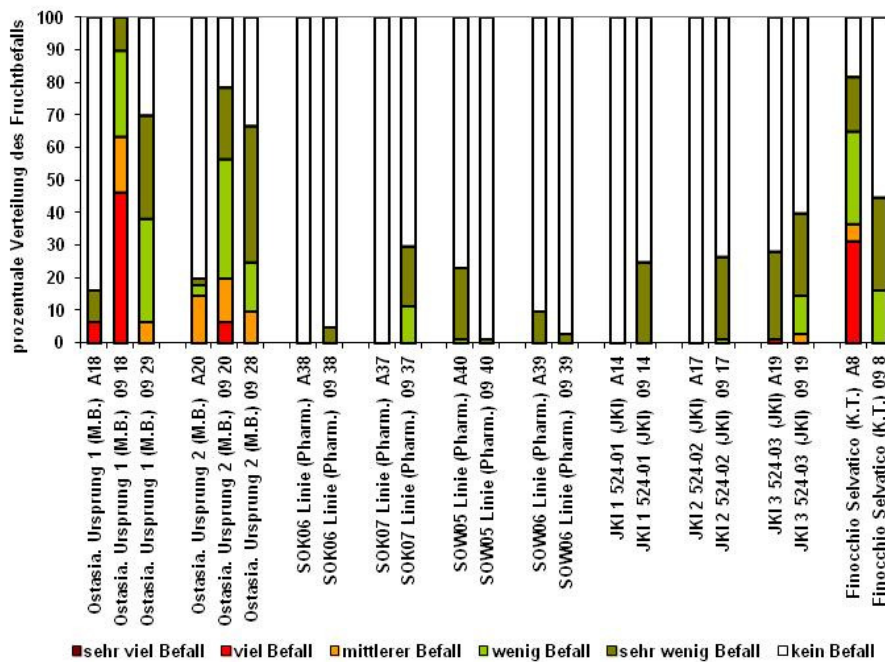
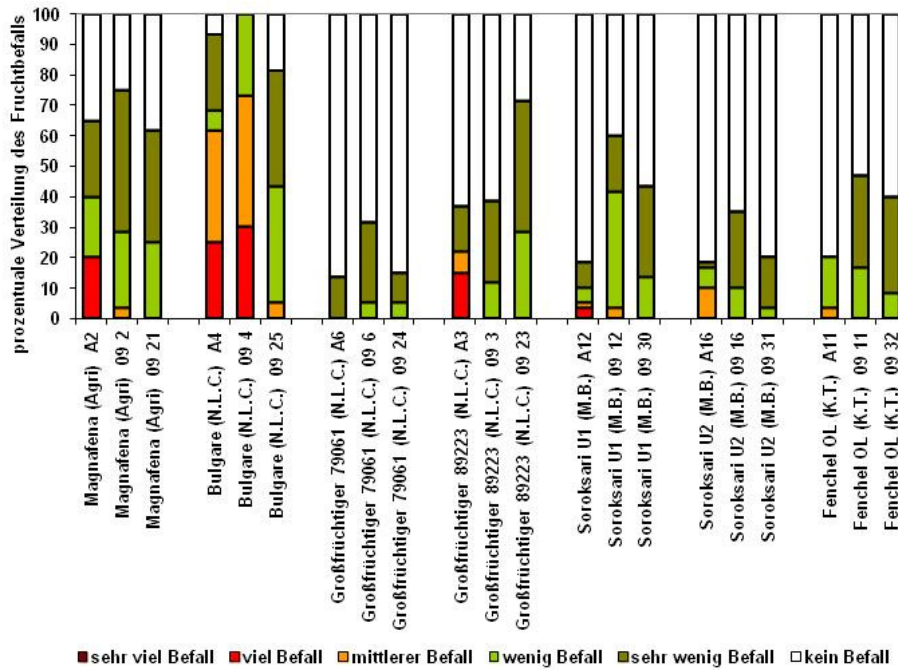


Abb. 69b: Sichtbonituren des Fruchtbefalls QLB 2009: Prozentuale Verteilung der 6 Befallsklassen der Früchte von Ausgangssaatgut (1.Säule einer Variante) und Erntegut (2. und 3. Wert = 1 – 2 Parzellen je Variante als Prüfglieder im Feldversuch).

Die prozentualen Verteilungen der Befallsklassen der Varianten, nach Sichtbonitur der Früchte (Abb. 69), zeigten deutlich die Auswirkungen des vergleichenden Anbaus. Je nach Herkunft der Fruchtproben stiegen oder fielen die Befallswerte. Die 'Berfena'-Herkünfte stammten überwiegend aus Feldanbau, d. h. der nun kleinere Parzellenanbau reduzierte den Befall. Die „exotischen“ Varianten (SOK07, SOK06, SOW06, SOW05, JKI 1 524-01, JKI 2 524-02, JKI 3 524-03) stammten aus Kleinvermehrungen oder waren Einzelpflanzen, hier stieg der Befallswert an.

Diese Beobachtung wurde bereits früher gemacht. Je mehr der Anteil der Sekundärinfektionen bei engem Pflanzenstand durch die gegenseitige Ansteckung anstieg,

desto höher war die Fruchtkontamination. Bei zahlreichen Versuchen, die in der Literatur beschrieben wurden, wurden die Auswirkungen der Sekundärinfektionen nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund konnte bisher auch keine geeignete Bekämpfungsstrategie entwickelt werden, die unbehandelte Kontrolle stand direkt neben den anderen Prüfgliedern. Die Unterschiede zwischen den Behandlungen waren nur noch minimal.

Bei der Bewertung der Anfälligkeit ist daher der gemeinsame Anbau an einem Standort in Isolierungspartzen zwingend notwendig, um brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Bei Feldversuchen, deren Varianten direkt aneinander grenzen, können Windströme die Konidien problemlos verbreiten, was im Ergebnis zu kaum bonitierbaren Unterschieden führt.

Voraussetzung für z. B. Fungizidtestungen wäre natürlich der Anbau der gleichen Sorte in Einzelpartzen, die durch Isolierungsstreifen voneinander getrennt werden müssten. Dies ist im nachfolgenden Projekt geplant.

Bei den vorgestellten zwei Versuchen von 2009 überwogen bei der Befallsbonitur klar die großen Sortenunterschiede im sehr heterogenen Sortiment.

Wesentliches Ziel im Projekt war die Untersuchung des Einflusses des Ausgangsfruchtbefalls bei einer aktuellen Sorte und nicht die Durchführung von Sortenvergleichsversuchen, wie sie in Absprache mit den Projektpartnern im Frühjahr 2009 geplant wurden.

Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Jahren das Testsortiment verändert. Es wurden 'Berfena'-Herkünfte mit unterschiedlichem Ausgangsbefall angebaut, sowie zwei als resistent geltende Produktionssorten aus Bulgarien.

1.3.3.2 Feldversuche QLB und KAD 2010-2011

In den beiden Jahren 2010 und 2011 wurden 10 ausgewählte Sorten (40 Isolierungsparzellen, 4 Wiederholungen = 36 bonitierte Pflanzen pro Variante) in Maisisoliierungsparzellen an zwei Standorten (QLB und KAD) angebaut. Es erfolgte ebenfalls eine wöchentliche Sichtbonitur des Befalls während der epidemischen Phase des Erregers über 15 Wochen. Zusätzlich wurden die AUDPC-Werte über die gesamte Epidemiedauer errechnet. Von je 9 Pflanzen pro Parzelle wurde 2010 der Ertrag ermittelt. 2011 war dies aufgrund eines starken Hagelschadens in QLB nicht möglich. In beiden Jahren wurden aussagekräftige Fruchtproben geerntet und aufbereitet. Der Befall der Fruchtproben wurde im PTA-ELISA quantifiziert.

Ausgangsbefall der Fruchtchargen für die Versuchsjahre 2010-2011

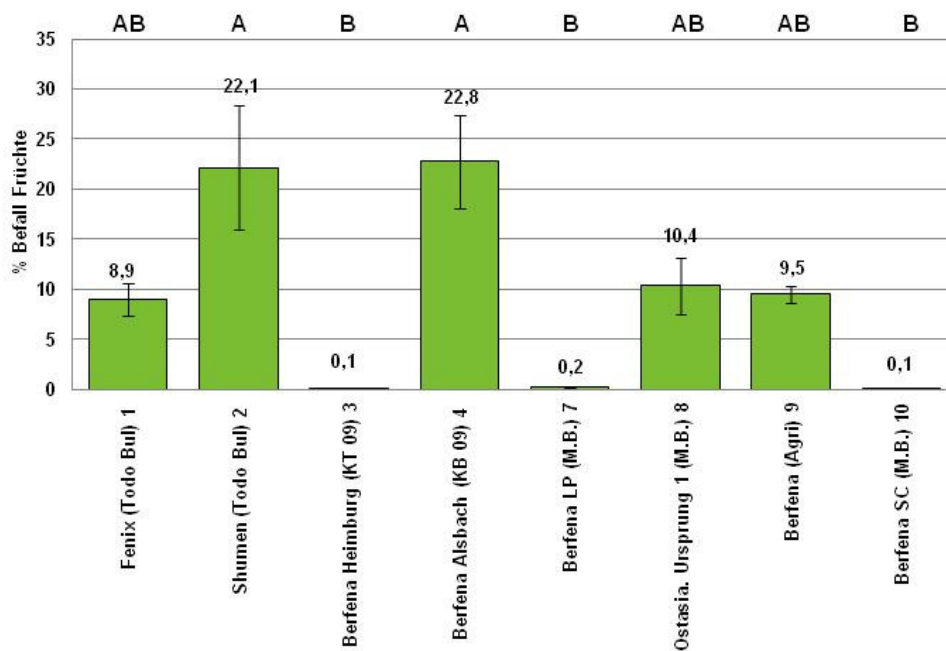


Abb. 70: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Fruchtbefalls des Ausgangssaatgutes der Feldversuche QLB und KAD 2010-2011.

Der Ausgangsbefall der Varianten für den Feldversuch (Abb. 70) war bewusst sehr heterogen gewählt. Zwei Sorten 'Shumen (Todo Bul) 2' und 'Berfena Alsbach (KB 09) 4' waren stark befallen, drei Sorten ('Berfena Heimburg (KT 09) 3', 'Berfena LP (M.B.) 7', 'Berfena SC (M.B.) 10') wiesen sehr geringe Werte auf und drei Sorten ('Fenix (Todo Bul) 1', 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' und 'Berfena (Agri) 9') lagen im mittleren Befallsbereich. Die Parzellen mit den Saatgutmischungen bestanden aus einem Mix aus wenig und stark befallenem Saatgut ('Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Alsbach (KB 09) 5') und aus einem Mix aus Früchten mit wenig und mittlerem Befall ('Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Berfena (Agri) 6').

1.3.3.2.1 Feldversuch QLB 2010

1.3.3.2.1.1 Epidemische Befallsentwicklung

Die Befallsverläufe und AUDPC-Werte (Abb. 71 und 72) zeigten eine ungleich schnelle Befallsentwicklung in den Parzellen. 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' zeigte die ersten Symptome und den schnellsten Befallsverlauf. Diese Sorte wies auch den signifikant höchsten AUDPC-Wert auf. 'Berfena (Agri) 9' war ebenfalls sehr anfällig, sie war die am zweitstärksten befallene Variante. Beide lagen mit ihren Ausgangsfruchtbefallswerten im mittleren Bereich. 'Fenix (Todo Bul) 1' und 'Shumen (Todo Bul) 2' waren deutlich weniger infiziert, es handelte sich um höher wüchsige Sorten, mit einem späteren Blühtermin als die moderneren Hochleistungssorten. Beide waren auch signifikant geringer anfällig als die anderen Prüfglieder (Abb. 72). 'Berfena SC (M.B.) 10', laut Bezeichnung eine 'Berfena'-Akzession, verhielt sich deutlich anders als die anderen Vermehrungen dieser Sorte. Sie zeigte eine deutlich geringere Anfälligkeit gegenüber dem Erregerbefall und unterschied sich auch signifikant von den anderen Akzessionen. In der Doldenabreife war sie langsamer, was den Doldenstielbefall (Abb. 73) gleichzeitig herabsetzte. Die Mixparzellen ('Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Alsbach (KB 09) 5' und 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Berfena (Agri) 6') unterschieden sich nur gering voneinander.

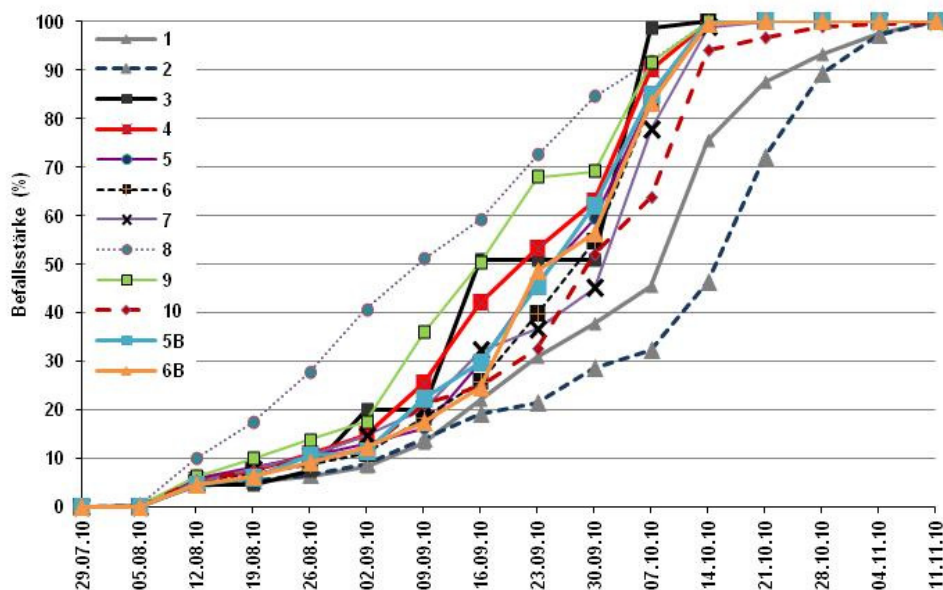


Abb. 71: Befallskurven (durch *M. anethi* befallene Blattfläche in %) der 12 Varianten des Feldversuchs QLB 2010. **Variantenbezeichnung:** 1: 'Fenix (Todo Bul) 1'; 2: 'Shumen (Todo Bul) 2'; 3: 'Berfena Heimburg (KT 09) 3'; 4: 'Berfena Alsbach (KB 09) 4'; 5: Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A; 6: Mix Berfena Heimburg (KT 09) 6A; 7: 'Berfena LP (M.B.) 7'; 8: 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8'; 9: 'Berfena (Agri) 9'; 10: 'Berfena SC (M.B.) 10'; 5B: Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B; 6B: Mix Berfena (Agri) 6B.

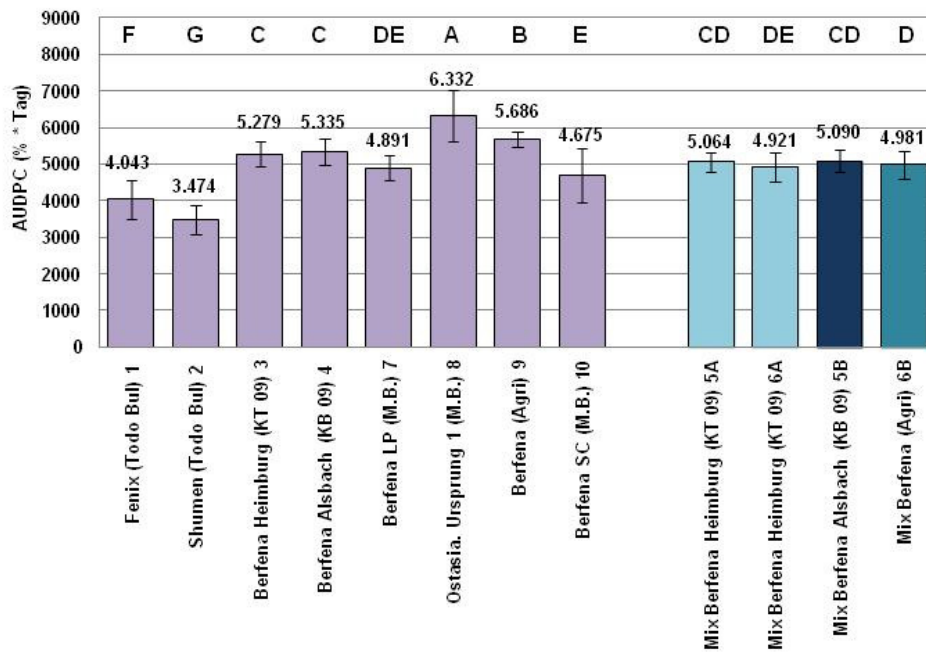


Abb. 72: Vergleich der 12 Varianten des Feldversuchs QLB 2010 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

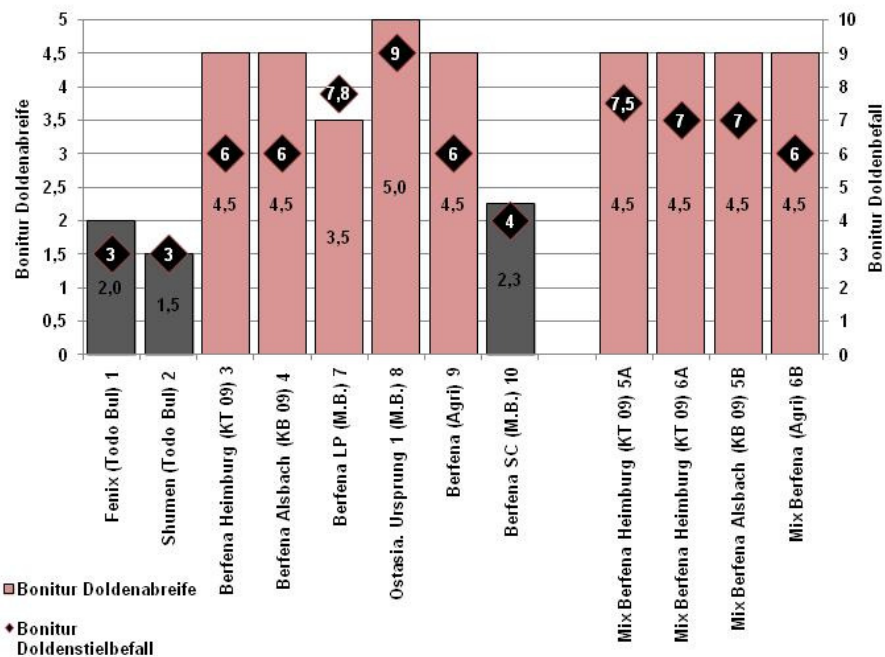


Abb. 73: Zusammenhang zwischen Doldenabreife (Säulen) und Doldenbefall (Raute) von 12 Sorten und Herkünften des Feldversuchs QLB 2010. **Doldenabreifestadium** (Anfang November): Boniturnoten: 1 = Doldereife bei einigen Primärdolden, 2 = alle Primärdolden abgereift, 3 = Dolden überwiegend abgereift, 4 = alle Dolden braun, Stängel noch grün, 5 = alle Dolden und obere Stängel braun, erster Samenausfall. **Doldenstielbefallssymptome:** Boniturnote (1 - 9) des sichtbaren *M. anethi*-Befalls.

1.3.3.2.1.2 Ertrag

Der Ertragswert (Abb. 74) und der AUDPC-Wert waren nicht korreliert. Signifikante Unterschiede traten zwischen den 'Mix-Parzellen' (348 – 316 g) und 'Berfena Alsbach (KB 09) 4' (318 g) mit 'Berfena LP (M.B.) 7' (84 g) und 'Ostasia. Ursprung 1

(M.B.) 8' (48 g) auf. Der Ertrag war überwiegend sortenbeeinflusst, nicht befallsbedingt. Die Hochleistungssorten 'Berfena' wiesen die höchsten Erträge auf, 'Berfena LP (M.B.) 7' (84 g) unterschied sich wiederum deutlich von den anderen Vermehrungen dieser Sorte.

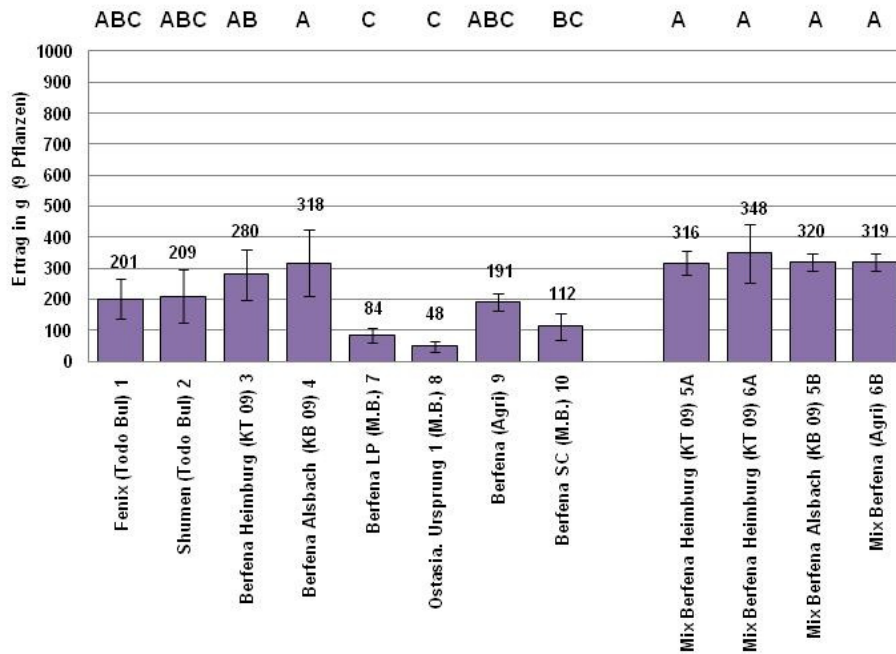


Abb. 74: Ertrag in g (9 Pflanzen) der Varianten des Feldversuchs QLB 2010.

1.3.3.2.1.3 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

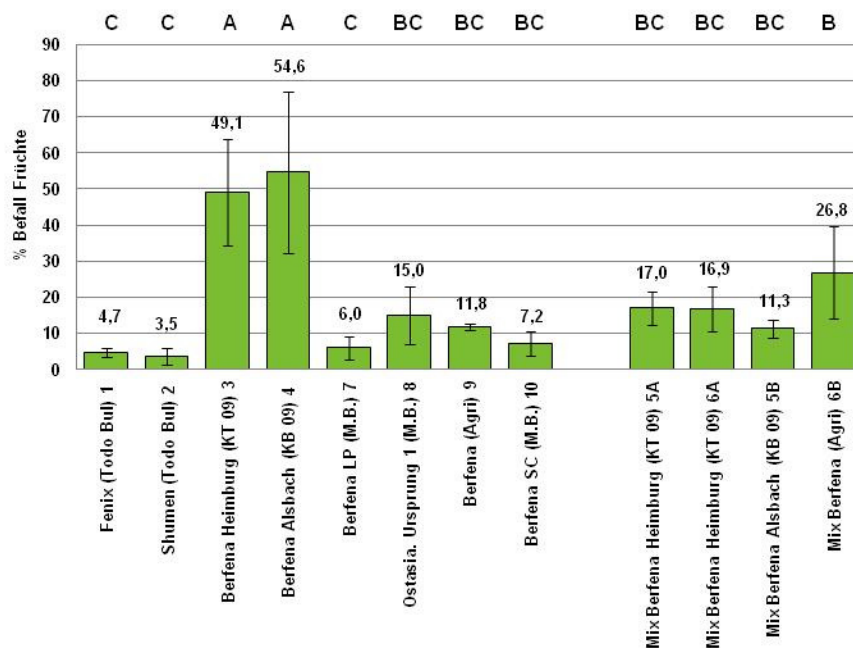


Abb. 75: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Erntegutes des Feldversuches QLB 2010. Die ELISA-Ergebnisse der Fruchtchargen (Abb. 75) waren signifikant korreliert ($r = 0.872$), die Testgenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Befallswerte war folglich sehr

gut. Die hohen Standardabweichungen der Varianten kamen erst durch die großen Befallsunterschiede zwischen den Wiederholungen (Parzellen) zustande. Die Epidemieverläufe in den Pflanzenbeständen der Kleinparzellen variierten, was zu mehr oder weniger stark befallenen Einzelproben führte.

'Berfena Alsbach (KB 09) 4' (54,6 %) und 'Berfena Heimburg (KT 09) 3' (49,1 %) waren signifikant am stärksten infiziert. Der Mix dieser beiden Varianten war sehr viel geringer befallen ('Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A' (17 %) und 'Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B' (11,3%)). Alle anderen Varianten wiesen zwischen 3,5 % und 16,8 % Fruchtbefall auf. PTA-Fruchtbefallswert war nicht mit Ertrag- oder AUDPC-Wert korreliert.

1.3.3.2.2 Feldversuch KAD 2010

1.3.3.2.2.1 Epidemische Befallsentwicklung

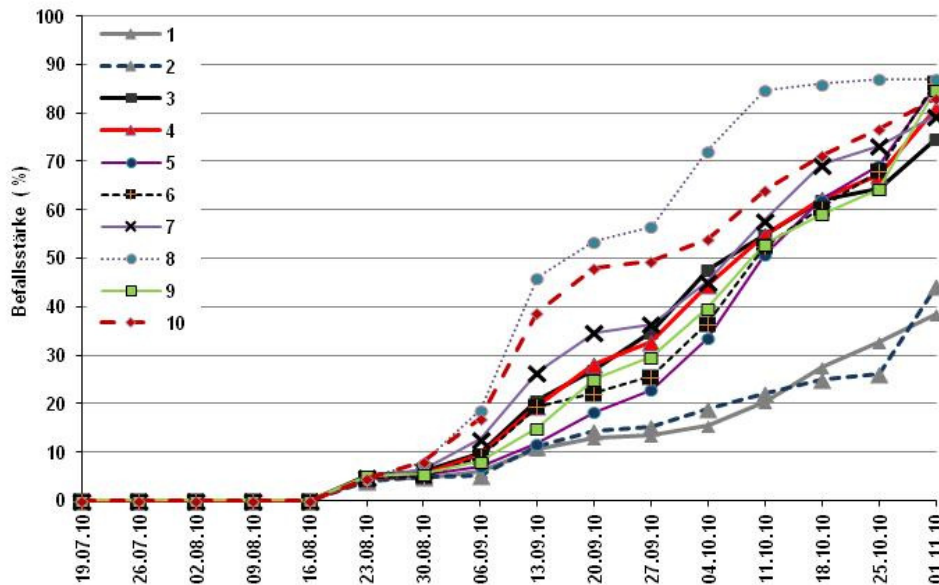


Abb. 76: Befallskurven (durch *M. anethi* befallene Blattfläche in %) der 10 Varianten des Feldversuchs KAD 2010. **Variantenbezeichnung:** 1: 'Fenix (Todo Bul) 1'; 2: 'Shumen (Todo Bul) 2'; 3: 'Berfena Heimburg (KT 09) 3'; 4: 'Berfena Alsbach (KB 09) 4'; 5: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Alsbach (KB 09) 5'; 6: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) + Berfena (Agri) 6'; 7: 'Berfena LP (M.B.) 7'; 8: 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8'; 9: 'Berfena (Agri) 9'; 10: 'Berfena SC (M.B.) 10'.

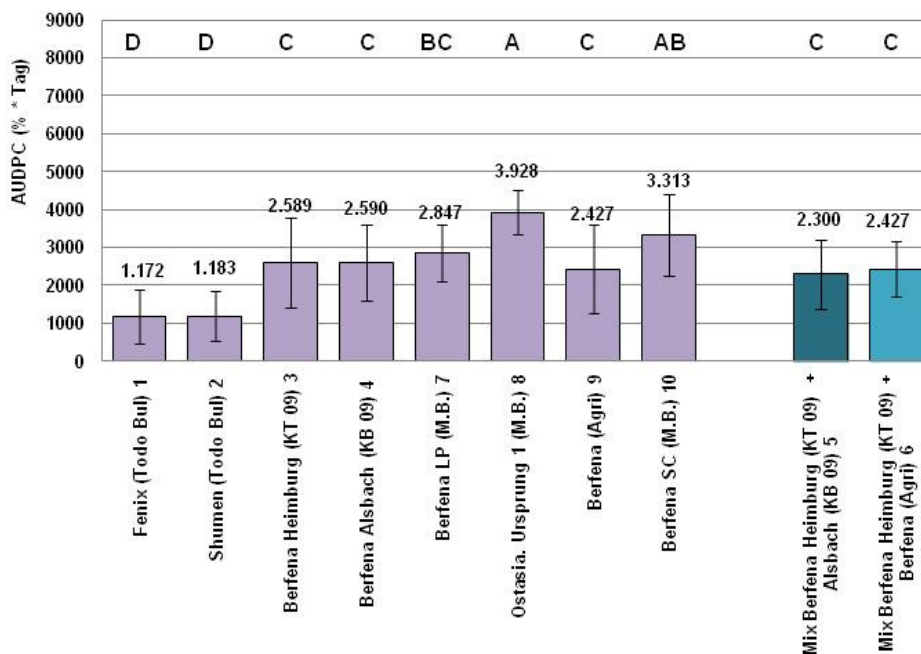


Abb. 77: Vergleich der 10 Varianten des Feldversuchs KAD 2010 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die Befallskurven zahlreicher Varianten waren in diesem Jahr sehr flach (Abb. 76). 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' und 'Berfena SC (M.B.) 10' zeigten, trotz des

schwachen Befalls in diesem Jahr in KAD, noch eine vergleichsweise rasche Befallszunahme. 'Fenix (Todo Bul) 1' und 'Shumen (Todo Bul) 2' wiesen bis zum Boniturende noch fast alle Blätter auf, die Symptombildung war bei ihnen gering. Die anderen Varianten lagen eng zusammen, es zeigten sich kaum Unterschiede in der epidemischen Entwicklungsgeschwindigkeit (Abb. 76).

Die AUDPC-Werte (Abb. 77) waren im Vergleich zu QLB 2010 sehr niedrig. 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' wies signifikant den höchsten Wert, 'Fenix (Todo Bul) 1' und 'Shumen (Todo Bul) 2' die niedrigsten Werte auf.

1.3.3.2.2 Ertrag

Der Ertrags- und AUDPC-Wert waren nicht korreliert, die Sorteneigenschaften waren dominanter als der Einfluss des geringen Befalls an diesem Standort. 'Berfena Alsbach (KB 09) 4' (835 g) wies signifikant den höchsten, 'Berfena LP (M.B.) 7' (335 g) den niedrigsten Ertrag auf (Abb. 78).

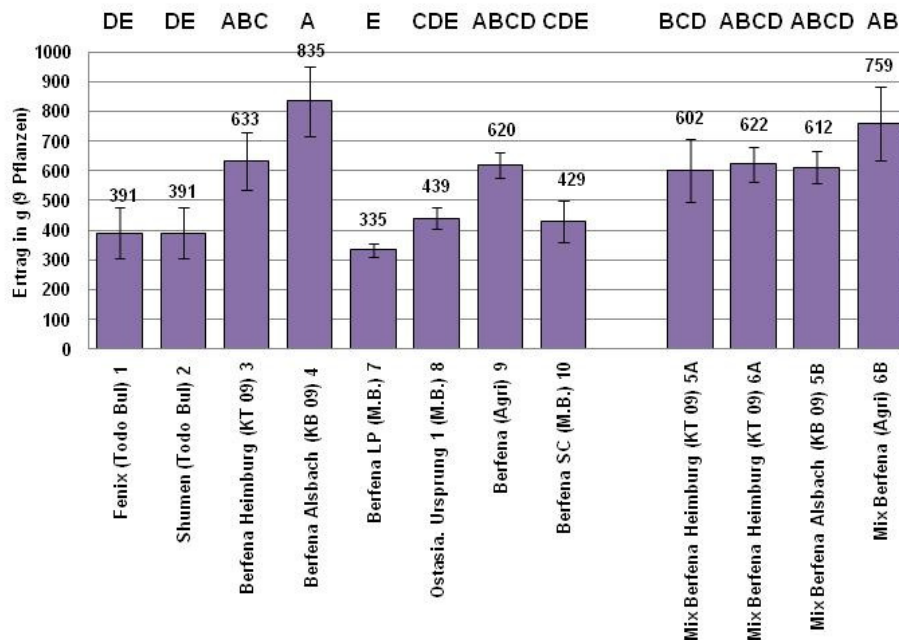


Abb. 78: Ertrag in g (9 Pflanzen) der 12 Varianten des Feldversuchs KAD 2010.

1.3.3.2.2.3 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

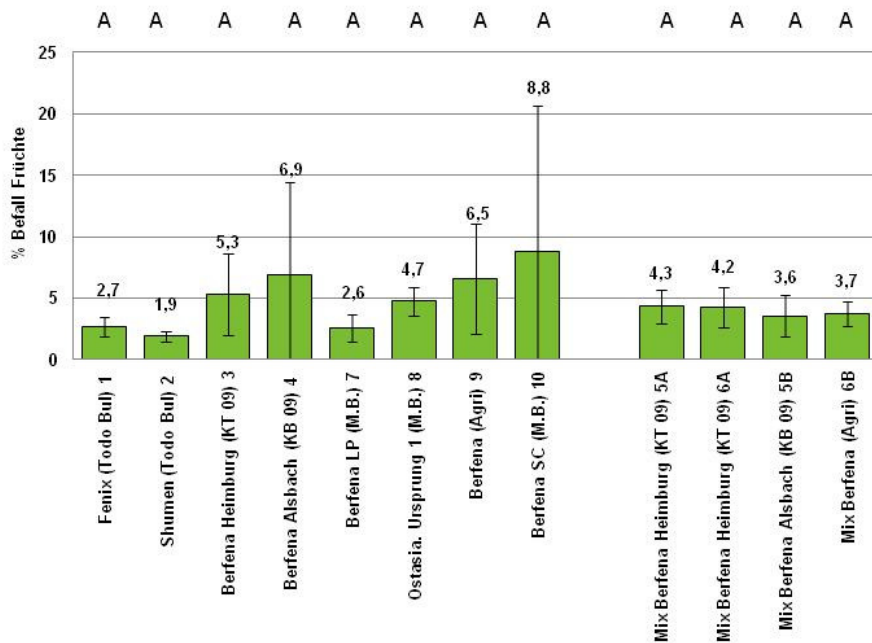


Abb. 79: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Fruchtbefalls des Erntegutes des Feldversuchs KAD 2010.

Beide ELISA-Testungen (Abb. 79) waren signifikant korreliert ($r = 0,834$). Die Standardabweichungen zwischen den Wiederholungen waren wiederum sehr hoch, was sich besonders beim geringen Befallswerten stark zeigte. Es ergaben sich keine rechnerischen Unterschiede zwischen den Varianten. Ertrags- und AUDPC-Wert waren mit dem PTA-ELISA für den Fruchtbefall nicht korreliert.

1.3.3.2.3 Feldversuch QLB 2011

1.3.3.2.3.1 Epidemische Befallsentwicklung

Die Variantenwiederholungen unterschieden sich auf dem Feld zu Beginn des Pflanzenwachstums sehr stark. Durch eine ungewöhnliche Trockenheit nach der Aussaat waren die ersten beiden Wiederholungen frühzeitiger aufgelaufen als die anderen beiden. Dieser zeitliche Unterschied in der Entwicklung beeinflusste die Befallsentwicklung bis zur Erntezeit. Den Blütezeitpunkt verschob sich leicht, ca. 7 Tage, was sich auch auf die Befallsentwicklung auswirkte. Innerhalb der Varianten waren die Standardabweichungen daher deutlich höher als in den vorangegangenen Jahren. 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' war signifikant am stärksten befallen und wies auch die schnellsten Befallszunahme auf (Abb. 80 und 81).

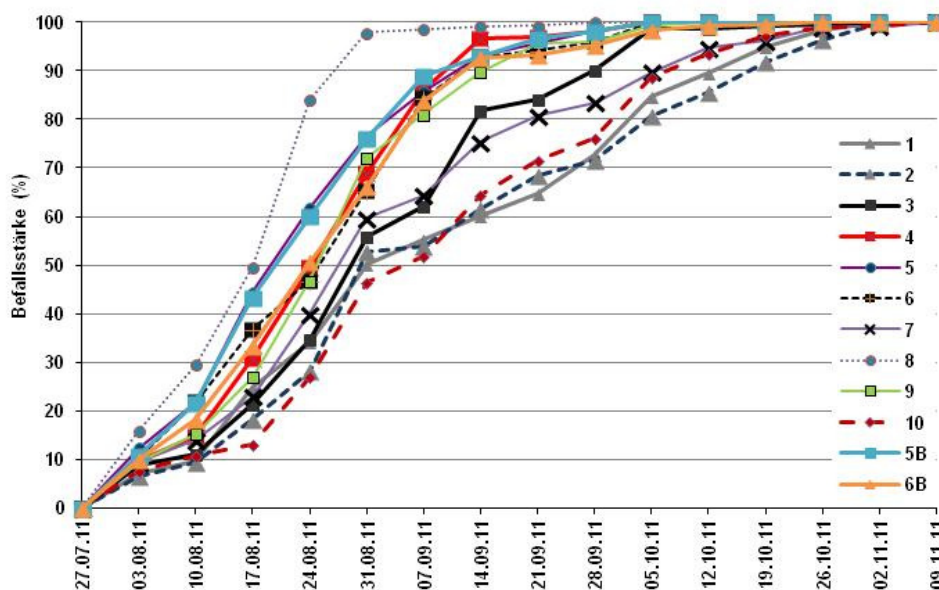


Abb. 80: Befallskurven (durch *M. anethi* befallene Blattfläche in %) der 24 Varianten des Feldversuchs 2011. Variantenbezeichnung: 1: 'Fenix (Todo Bul) 1'; 2: 'Shumen (Todo Bul) 2'; 3: 'Berfena Heimburg (KT 09) 3'; 4: 'Berfena Alsbach (KB 09) 4'; 5: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A'; 6: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) 6A'; 7: 'Berfena LP (M.B.) 7'; 8: 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8'; 9: 'Berfena (Agri) 9'; 10: 'Berfena SC (M.B.) 10'; 5B: 'Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B'; 6B = 'Mix Berfena (Agri) 6B'.

Der höchsten AUDPC-Wert (Abb. 81) wies 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' (8570 % Befall * Tag) auf. 'Berfena SC (M.B.) 10' (6276 % Befall * Tag), 'Fenix (Todo Bul) 1' (6274 % Befall * Tag) und 'Shumen (Todo Bul) 2' (6123 % Befall * Tag) lagen wiederum auf den hinteren Stellen der Rangfolge. 'Berfena Alsbach (KB 09) 4', 'Berfena (Agri) 9' und die Mix-Parzellen waren laut AUDPC-Wert gleichermaßen (7978 - 7636 % Befall * Tag) stark infiziert. 'Berfena Heimburg (KT 09) 3' (6970 % Befall * Tag) unterschied sich rechnerisch von den anderen, anscheinend beeinflusste der geringe Ausgangsbefall des Saatgutes die epidemische Kraft des Erregers in diesem Jahr, welches ein vergleichsweise hohes Befallsniveau hatte.

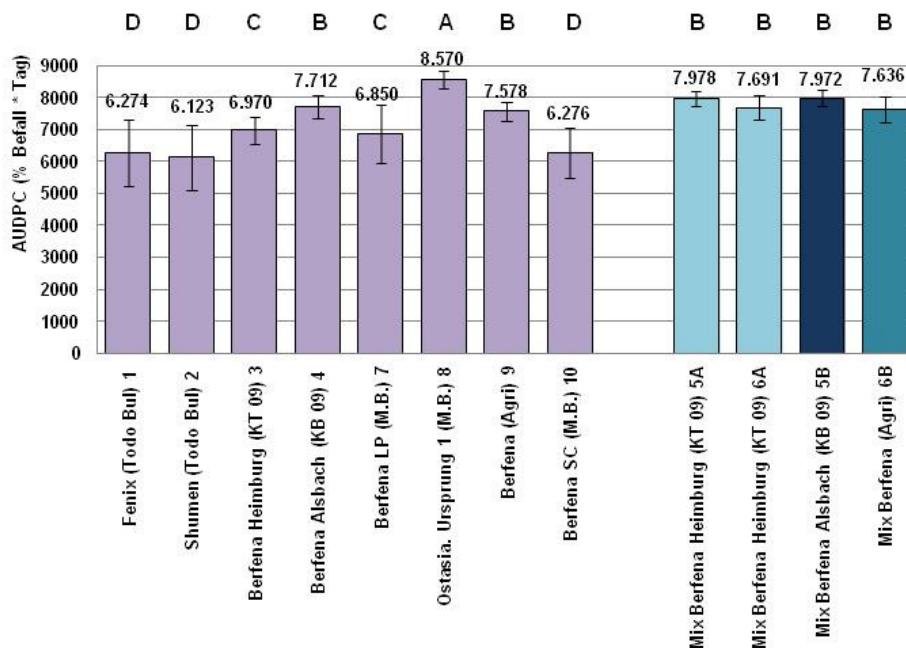


Abb. 81: Vergleich der 10 Varianten des Feldversuchs QLB 2011 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

1.3.3.2.3.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

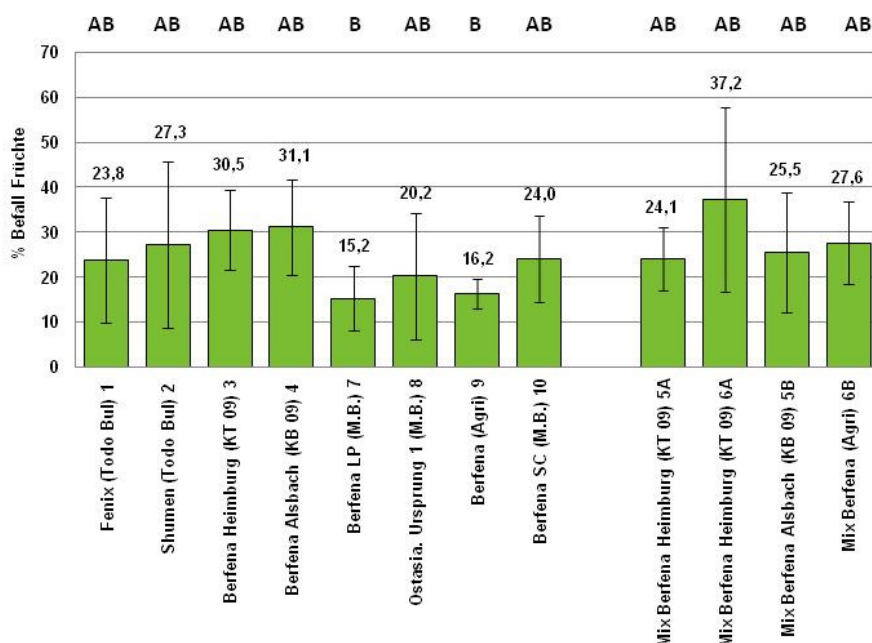


Abb. 82: Semi-quantitative PTA-ELISA-Befall des Erntegutes des Feldversuchs QLB 2011.

Die ELISA-Ergebnisse der Früchte (Abb. 82) waren signifikant korreliert ($r = 0,894$), die vier Wiederholungen auf dem Feld führten wieder zu größeren Standardabweichungen. Aus diesem Grund ergaben sich keine großen Unterschiede zwischen den Varianten, 'Berfena LP (M.B.) 7' (15,2 %) und 'Berfena (Agri) 9' (16,2 %) wiesen etwas geringere Pilzgehalte auf. ELISA-Fruchtbefall und AUDPC zeigten keinen rechnerischen Zusammenhang.

1.3.3.2.4 Feldversuch KAD 2011

1.3.3.2.4.1 Epidemische Befallsentwicklung

Die Variante 8 ('Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8') wies in diesem Jahr in KAD einen starken Befall mit falschem Mehltau auf. Dieser unterdrückte die Befallssymptome von *M. anethi*, was eine zuverlässige Bonitur verhinderte. Aus diesem Grund wurde die Variante 8 aus der Verrechnung herausgenommen.

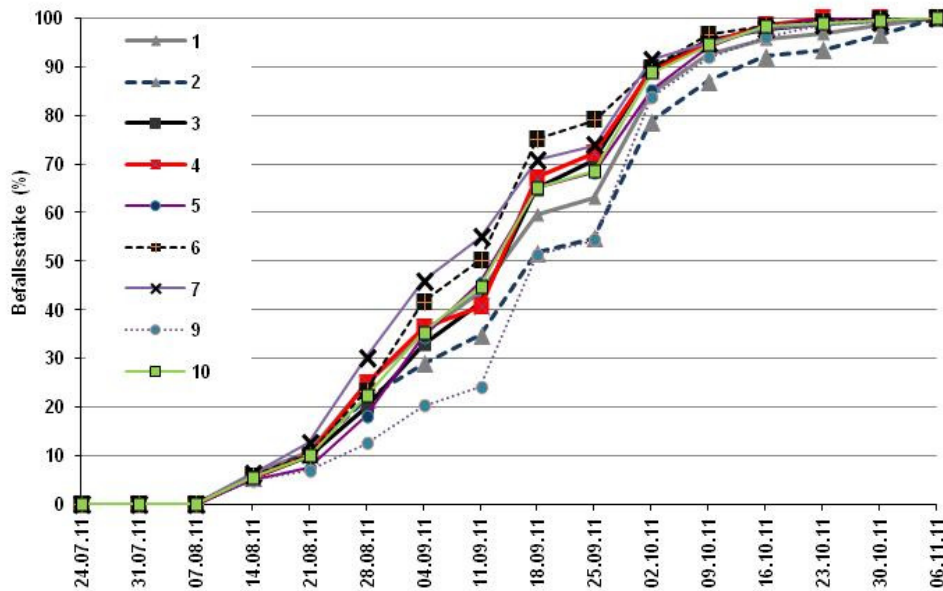


Abb. 83: Befallskurven (durch *M. anethi* befallene Blattfläche in %) der 10 Varianten des Feldversuchs KAD 2011. 2011. Variantenbezeichnung: 1: 'Fenix (Todo Bul) 1'; 2: 'Shumen (Todo Bul) 2'; 3: 'Berfena Heimburg (KT 09) 3'; 4: 'Berfena Alsbach (KB 09) 4'; 5: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A'; 6: 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) 6A'; 7: 'Berfena LP (M.B.) 7'; 9: 'Berfena (Agri) 9'; 10: 'Berfena SC (M.B.) 10'; 5B: 'Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B'; 6B = 'Mix Berfena (Agri) 6B'.

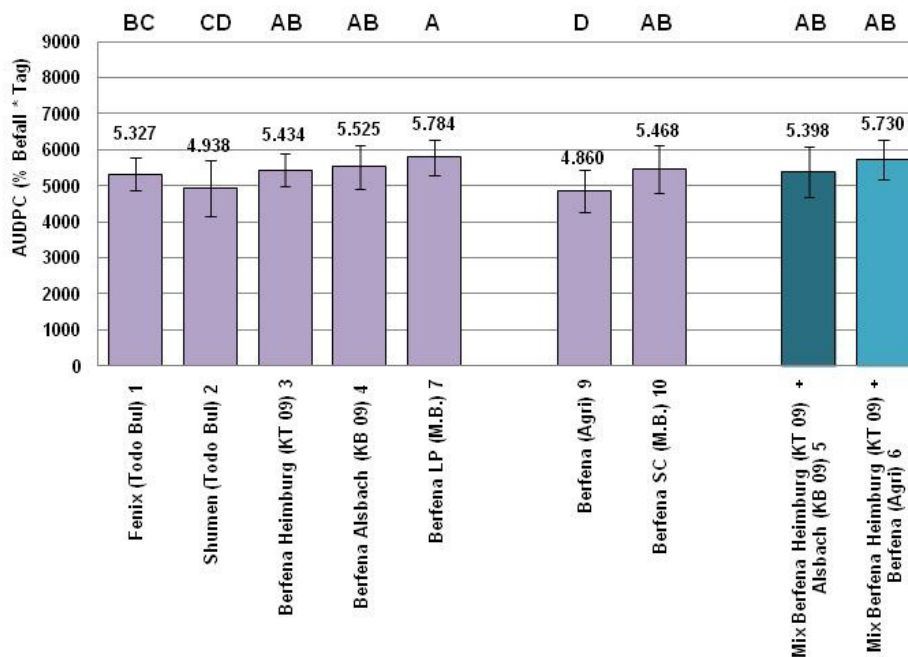


Abb. 84: Vergleich der 10 Varianten des Feldversuchs 2011 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*. Signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Die Linien der Befallsverläufe lagen recht eng zusammen (Abb. 83). Die AUDPC-Werte wiesen signifikante Unterschiede zwischen 'Berfena LP (M.B.) 7' (5784 % * Tag) und 'Fenix (Todo Bul) 1' (5327 % * Tag), 'Shumen (Todo Bul) 2' (4938 % * Tag) und 'Berfena (Agri) 9' (4860 % * Tag) nach (Abb. 84).

1.3.3.2.4.2 PTA-ELISA Befallsbonitur des Erntegutes

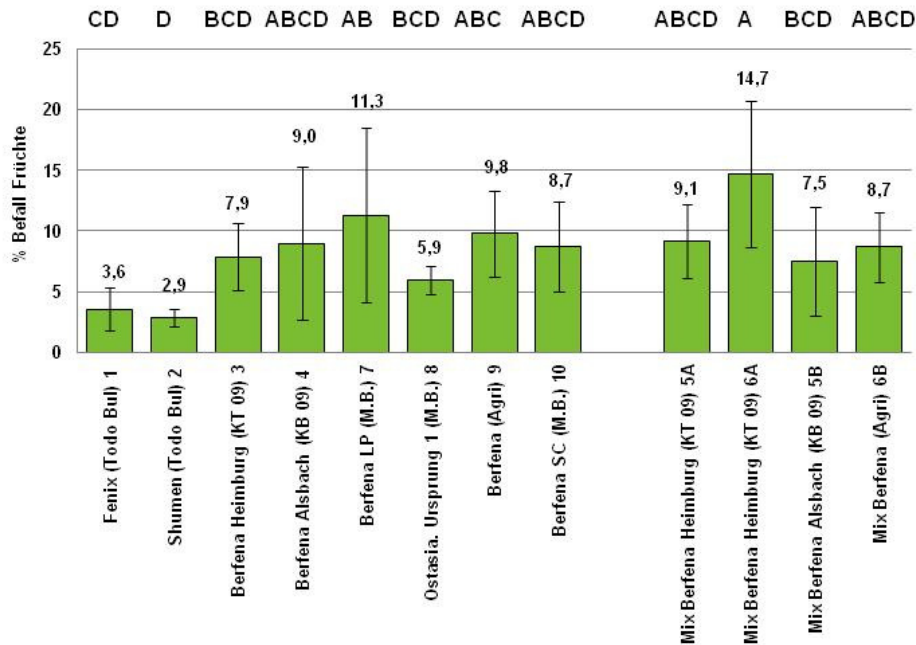


Abb. 85: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Erntegutes des Feldversuchs KAD 2011.

Die Ergebnisse desn PTA-ELISA (Abb. 85) waren signifikant korreliert ($r = 0,706$). Rechnerische Unterschiede bestanden zwischen 'Mix Berfena Heimburg (KT 09) 5A' (14,7 %) und 'Berfena Heimburg (KT 09) 3' (7,9 %), 'Mix Berfena Alsbach (KB 09) 5B' (7,5 %), 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' (5,9 %), 'Fenix (Todo Bul) 1' (3,6 %) und 'Shumen (Todo Bul) 2' (2,9 %). Es war kein Zusammenhang zwischen Fruchtbefall und AUDPC-Wert vorhanden.

1.3.3.2.5 Fazit der Feldversuche QLB und KAD 2010-11

1.3.3.2.5.1 Vergleich der Feldversuche (2010 und 2011)

Die AUDPC-Werte (Abb. 86) der beiden Versuche (gerechnet über 10 Varianten) am Standort Quedlinburg (QLB) waren signifikant korreliert ($r = 0,818$).

Von den insgesamt vier Versuchen an beiden Standorten (gerechnet über 9 Varianten (eine Sorte fiel wegen Mehltau aus der Bonitur heraus) waren nur die beiden Quedlinburger ($r = 0,802$) und der Klein-Altendorfer (KAD) 2010 mit dem Quedlinburger 2010 ($r = 0,705$) signifikant korreliert. Die beiden Klein-Altendorfer Versuche wiesen keine übereinstimmenden Ergebnisse auf.

Der Grad der Anfälligkeit der Sorten war über die Jahre und an den Standorten nicht signifikant, keine von ihnen war immer besonders anfällig. Die Standardabweichungen waren zu hoch, um rechnerische Unterschiede ermitteln zu können. 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' wies den höchsten AUDPC-Wert (6276 % * Tag) auf, gefolgt von 'Mix Berfena Heimbürg (KT 09) + Berfena (Agri) 6' (5355 % * Tag) und 'Berfena Alsbach (KB 09) 4' (5290 % * Tag). 'Shumen (Todo Bul) 2' (3929 % * Tag) und 'Fenix (Todo Bul) 1' (4204 % * Tag) waren als höher wüchsige Sorten weniger anfällig.

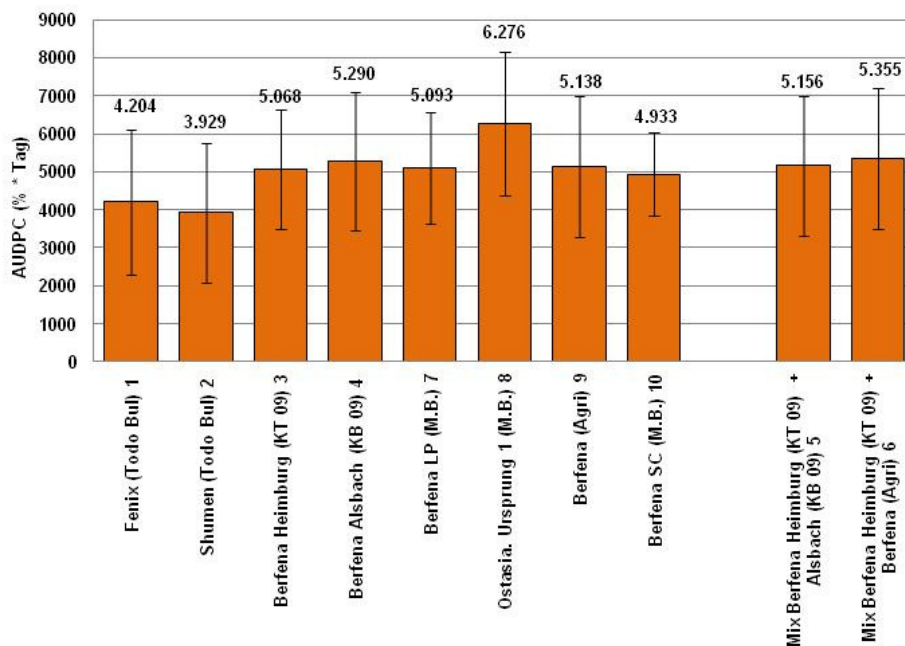


Abb. 86: Zusammenfassender Vergleich der 10 Varianten der Feldversuche QLB und KAD 2010-2011 anhand des Befalls (Fläche unter der Befallskurve AUDPC) durch *M. anethi*.

Das Wertenniveau der AUDPC-Werte (Abb. 87), Maß für die Stärke des Befalls über die Epidemiedauer, wies größere Schwankungen auf. Zwei Versuche (QLB 2010 und KAD 2011) waren ähnlich stark befallen. Der Standort KAD 2010 wies einen deutlich geringeren Befallsdruck auf. Da der erste Versuch an diesem Standort im Jahr 2009 keinen bonitierbaren Befall aufwies, konnte hier eine deutliche jährliche Steigerung des Befalls ermittelt werden. In QLB war das Niveau immer deutlich höher als in KAD, was bereits durch die Sichtbonitur der Versuche deutlich wurde. Besonders 'Berfena' zeigte recht früh große Blattverluste durch den starken epidemischen Befall.

Die Wertspannen des Befallsgrades (AUDPC-Wert) zwischen den Varianten waren bei drei Versuchen ähnlich, ein Versuch KAD 2011 war deutlich niedriger:

- QLB 2010: 2859 (Min. 3474; Max. 6332)
- QLB 2011: 2447 (Min. 3474; Max. 6332)
- KAD 2010: 2756 (Min. 3474; Max. 6332)
- KAD 2011: 924 (Min. 3474; Max. 6332)

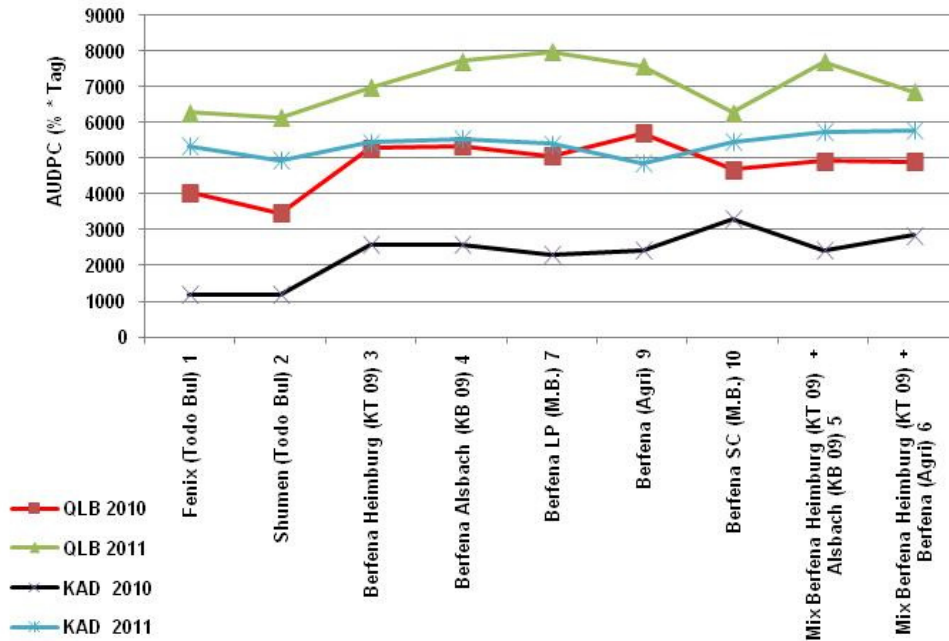


Abb. 87: AUDPC-Werte (% * Tag) der Varianten der Feldversuche 2010-2011 in QLB und KAD.

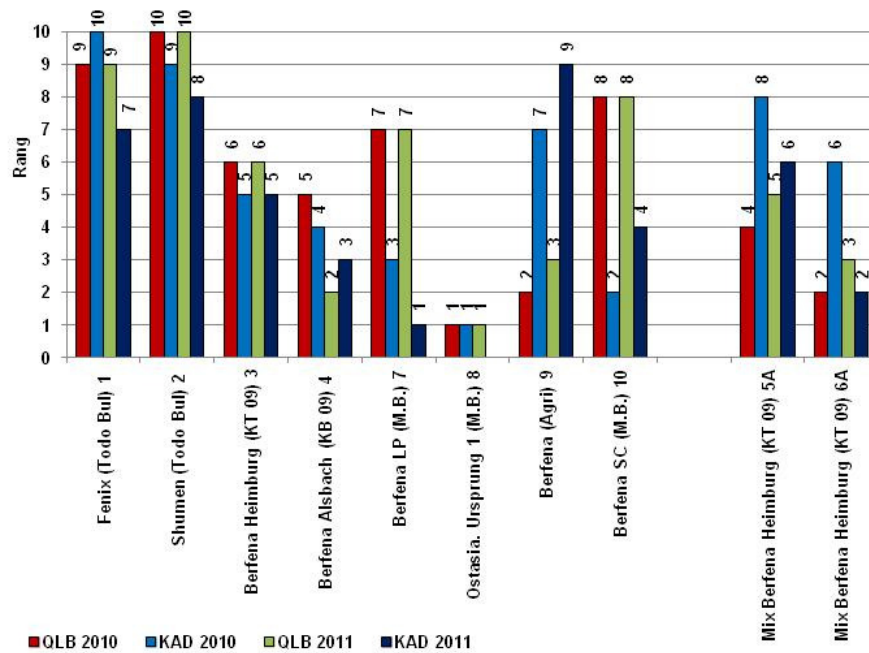


Abb. 88: Vergleich der Rangfolge der AUDPC-Werte der zwei Standorte (QLB und KAD) und Jahre.

Die Rangfolgen Befallsränge der Varianten über die Standorte und Jahre (Abb. 88) waren bei 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' einheitlich höher. Der Ausgangsbefall der Früchte war hier sehr niedrig, die Pflanzen entwickelten sich sehr rasch und waren eher niedrigwüchsig. Durch die frühe Blütezeit entwickelte sich die Epidemie früh und zeigte eine erstaunliche Aggressivität bei der Pflanzenschädigung. Die gesamte Pflanzenoberfläche war mit sporulierenden Konidienlagern überzogen. Sie reagierte als einzige Sorte immer gleichermaßen anfällig. Andere Sorten wie 'Fenix (Todo Bul) 1' und 'Shumen (Todo Bul) 2' zeigten ebenfalls eine konstante Reaktion, hier wenig anfällig. Recht einheitlich war auch 'Berfena Heimburg (KT 09) 3', eine Sortenherkunft mit sehr wenig Ausgangsbefall auf den Früchten. Die anderen 'Berfena'-Varianten waren innerhalb des Sortiments recht heterogen infiziert.

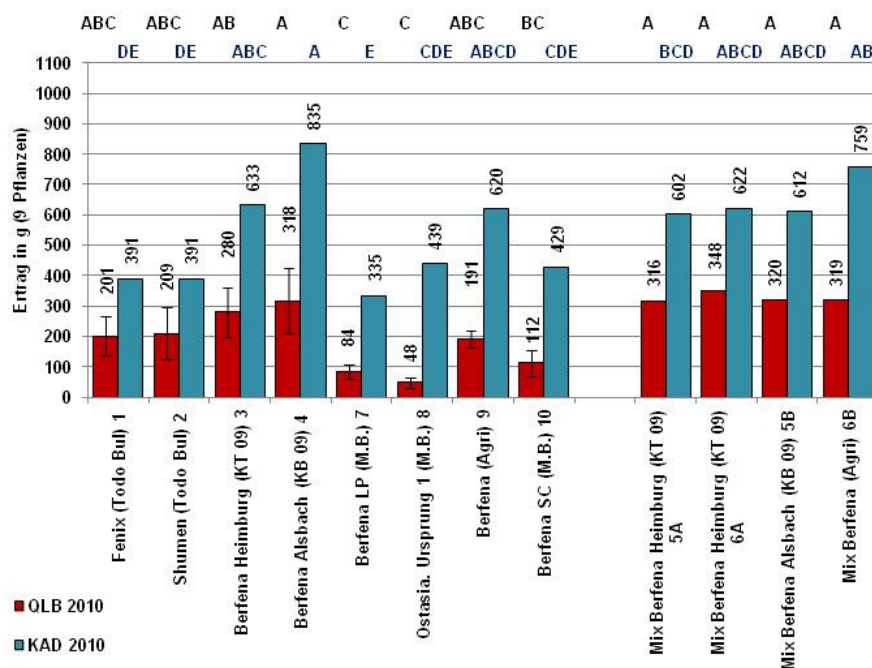


Abb. 89: Ertrag (9 Pflanzen) der Varianten 2010 in QLB und KAD.

Der Unterschied zwischen den beiden Standorten wurde auch im Ertrag deutlich (Abb. 89). Beide Versuchsergebnisse waren signifikant korreliert ($r = 0,764$). Die Pflanzen wurden aus gleichem Saatgut angezogen und in der gleichen Versuchsanlage kultiviert. Der Befall war im Niveau unterschiedlich hoch (siehe AUDPC). Am Standort KAD betrug die durchschnittliche Ertragssteigerung 160 %. Die Pflanzen waren deutlich höher, wüchsiger, sehr kräftig und vollfruchttragend. Der Blütezeitpunkt war im Vergleich zu QLB etwas verzögert, vermutlich bedingt durch das langsamere kräftige Wachstum.

Aus diesem Grund war der Ertrag nicht allein vom Befall beeinflusst, sondern überwiegend vom Standort.

1.3.3.2.5.2 Fazit Fruchtbonituren (Feldversuche 2010 und 11)

Zwischen den Fruchtbefallswerten der 4 Versuche (beide Standorte) bestand kein rechnerischer Zusammenhang. Eine klare Rangfolge in der Anfälligkeit war ebenfalls nicht vorhanden (Abb. 90).

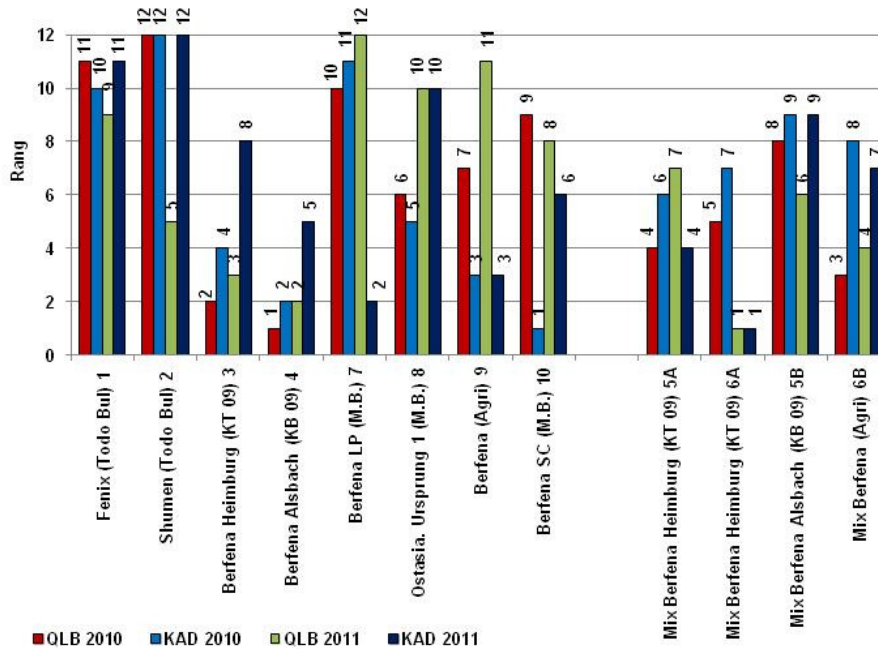


Abb. 90: Rangfolge des im PTA-ELISA ermittelten Fruchtbefallswertes der vier Feldversuche in QLB und KAD.

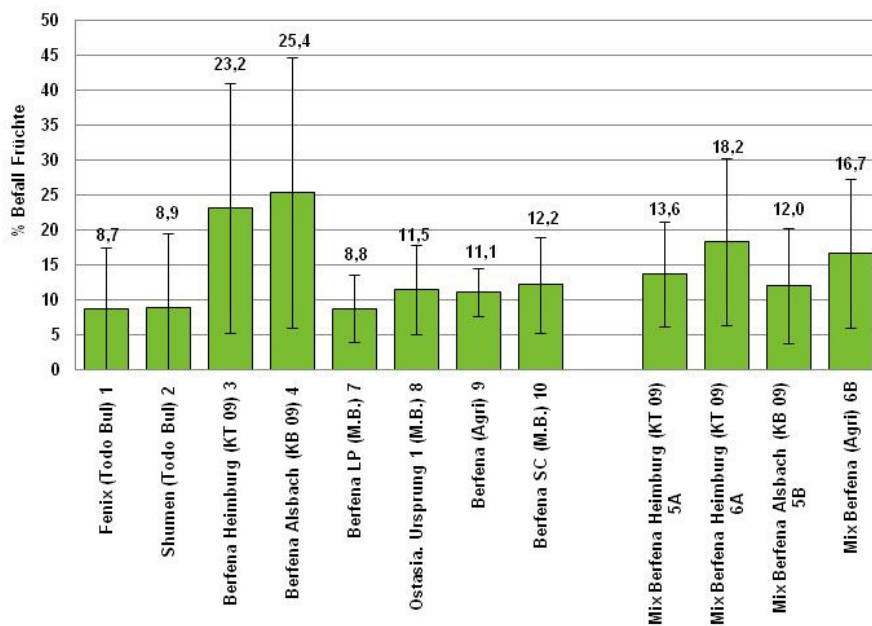


Abb. 91: Semi-quantitative PTA-ELISA-Bonitur des Erntegutes der vier Feldversuche in QLB und KAD.

Jede Variante wies mehr oder weniger starke Schwankungen im Fruchtbefall auf. Vergleichsweise hohe Gehalte waren regelmäßig bei 'Berfena Heimburg (KT 09) 3'

und 'Berfena Alsbach (KB 09) 4' zu finden. Diese beiden Herkünfte wiesen sehr unterschiedlichen Fruchtbefall (sehr niedrig und sehr hoch) am Ausgangssaatgut auf. Konstant niedrige Werte wiesen 'Fenix (Todo Bul) 1', 'Shumen (Todo Bul) 2' und 'Berfena LP (M.B.) 7' auf (Abb. 91).

Bei Betrachtung der Befallsdifferenz (Ernte - Aussaat) (Abb. 92), d. h. der Veränderung des Befallsniveaus zwischen Aussaat und Ernte, zeigte sich, dass einige Sorten an den beiden Standorten und den Jahren ähnlich reagierten. 'Berfena LP (M.B.) 7' und 'Berfena SC (M.B.) 10' zeigten jeweils ein Zunahme des Befalls, bei 'Shumen (Todo Bul) 2' reduzierte er sich dreimalig. Die Wertdifferenz war bei 'Berfena (Agri) 9' einheitlich klein. 'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' reagierte ebenfalls recht einheitlich, der Fruchtbefall war vergleichsweise niedrig, trotz des starken sichtbaren Befalls an der Pflanze.

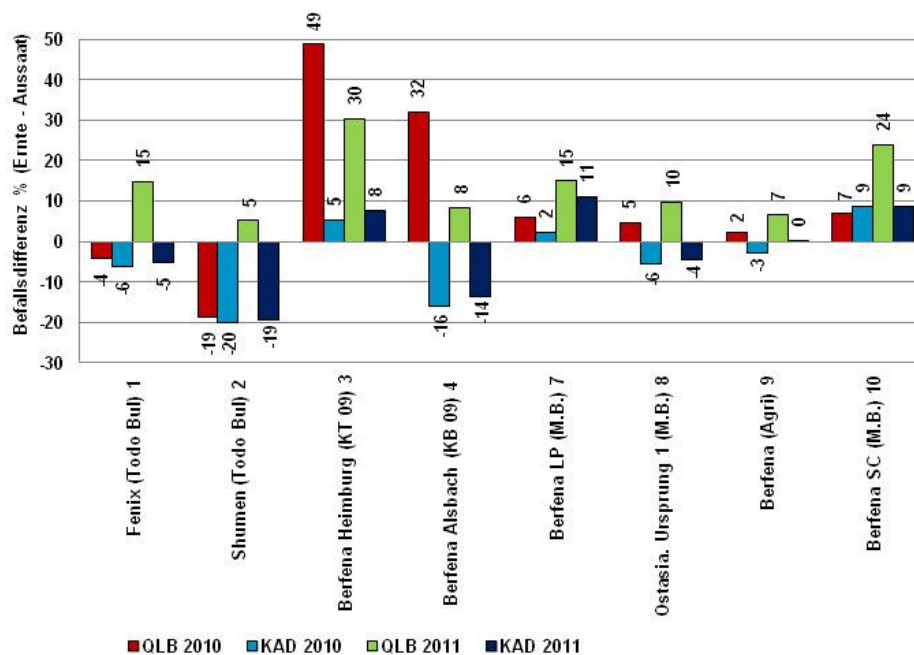


Abb. 92: Differenz zwischen Ausgangsbefall des Saatguts und Befall des Ernteguts (4 Versuche) anhand der PTA-ELISA Quantifizierung der Früchte.

Keine der angebauten Varianten war, nach Fruchtbefall, weniger anfällig als die anderen, die Standardabweichungen waren zwischen den Versuchen zu hoch. Bei der Analyse der Einzelwerte der Versuche wurde deutlich, dass sich die Wiederholungen auf dem Feld (Kleinparzellen) im Befallsniveau stark unterschieden.

Der ELISA lieferte aussagekräftige Werte für die 40 Einzelparzellen, die auch bei Testwiederholungen immer signifikant korreliert waren. Jedoch kam es zwischen den Einzelparzellen zu stark variierenden Befallswerten. Eine konstante Rangfolge der Anfälligkeit der angebauten Sorten war über den Fruchtbefallswert nicht zu ermitteln. Beide Standorte waren nachweislich so unterschiedlich, dass es zu sehr großen Abweichungen bei der Symptombildung kam, trotz des identischen Ausgangssaatgutes und der gleichen Feldversuchsanlage.

Die Wertspannen (% Fruchtbefall) zwischen den Varianten waren an den Standorten sehr unterschiedlich (Tab. 6).

Tab. 6: Befallsniveau der Früchte (%) der Feldversuche 2010-2011 an zwei Standorten

Standort / Jahr	Wertspanne	minimaler und maximaler Wert	
QLB 2010	51,10	3,5;	54,6
QLB 2011	22,00	15,2;	37,2
KAD 2010	6,92	1,9;	8,8
KAD 2011	11,80	2,9;	14,7

In QLB war das Befallsniveau der Früchte deutlich höher als in KAD, was bereits bei den Bonituren während der epidemischen Phase deutlich wurde.

KAD war im Vergleich zu QLB fast eine Gesundlage. Trotz des niedrigen sichtbaren Befalls war *M. anethi* im Erntegut präsent. Zu erkennbaren Ertragsausfällen kam es in den Versuchsjahren nicht, dazu waren die Ausgangsbedingungen (Größe der Parzellen, Anzahlen der Pflanzen) nicht geeignet.

Nach unseren Erfahrungen, die durch die Bonitur eines Totalausfalles (Abb. 93 - 94) bestätigt wurden, treten starke Ertragsausfälle bzw. Totalausfälle nur dann auf, wenn es bei einem sehr dichten Pflanzenbestand, Feuchtigkeit und Wind zu einer massenhaften Konidienproduktion und -verbreitung kommt. Obwohl die einzelnen Konidienlager des Pilzes mikroskopisch klein sind, konnte deren schlagartige Potenzierung große zusammenhängende Befallsflächen ergeben. Nach dem Absterben aller Blätter treten die Symptome an allen anderen Pflanzenteilen auf. Bei umfangreichen Neuinfektionen kommt es dann zu so starken Mycelentwicklungen, dass die Pflanzen großflächige schwarze Verkrustungen aufweisen. Als Symptom zeigt sich eine typische Doldenschwärzung, die Anthraknose des Fenchels. Die im Gewebe ablaufenden Mycelverwachsungen führen bei dünneren Stielen und Fruchtansätzen zur Abschnürung von der Wasserversorgung und dem Assimilatfluss. Die Früchte fallen massenweise ab, die Pflanzen weisen nur noch vereinzelt früher entwickelte Früchte an den Primärdolden auf. Diese Erscheinungen sind aber nicht so häufig zu beobachten.



Abb. 93: Stark mit *M. anethi* befallene Primärdolde auf einem Feld mit Totalverlust der Ernte (links oben); Fenchelpflanzen mit unterschiedlichen Doldenordnungen mit verbliebenen Früchten (oben rechts); Ansicht von drei Doldenordnungen bei sehr starkem pilzlichen Befall (unten links), Primärdolde weist als einzige noch wenige verbliebene Früchte auf; verbliebbend unreife Früchte der Primärdolde (unten rechts).



Abb. 94: Längsschnitt durch unbefallene grüne Fenchelspaltfrüchte (links) deutlich erkennbar die weißlichen Endospermkerne; Querschnitt (rechts) durch zwei reife Fenchelfrüchte mit jetzt hellgrauen Endospermkernen.

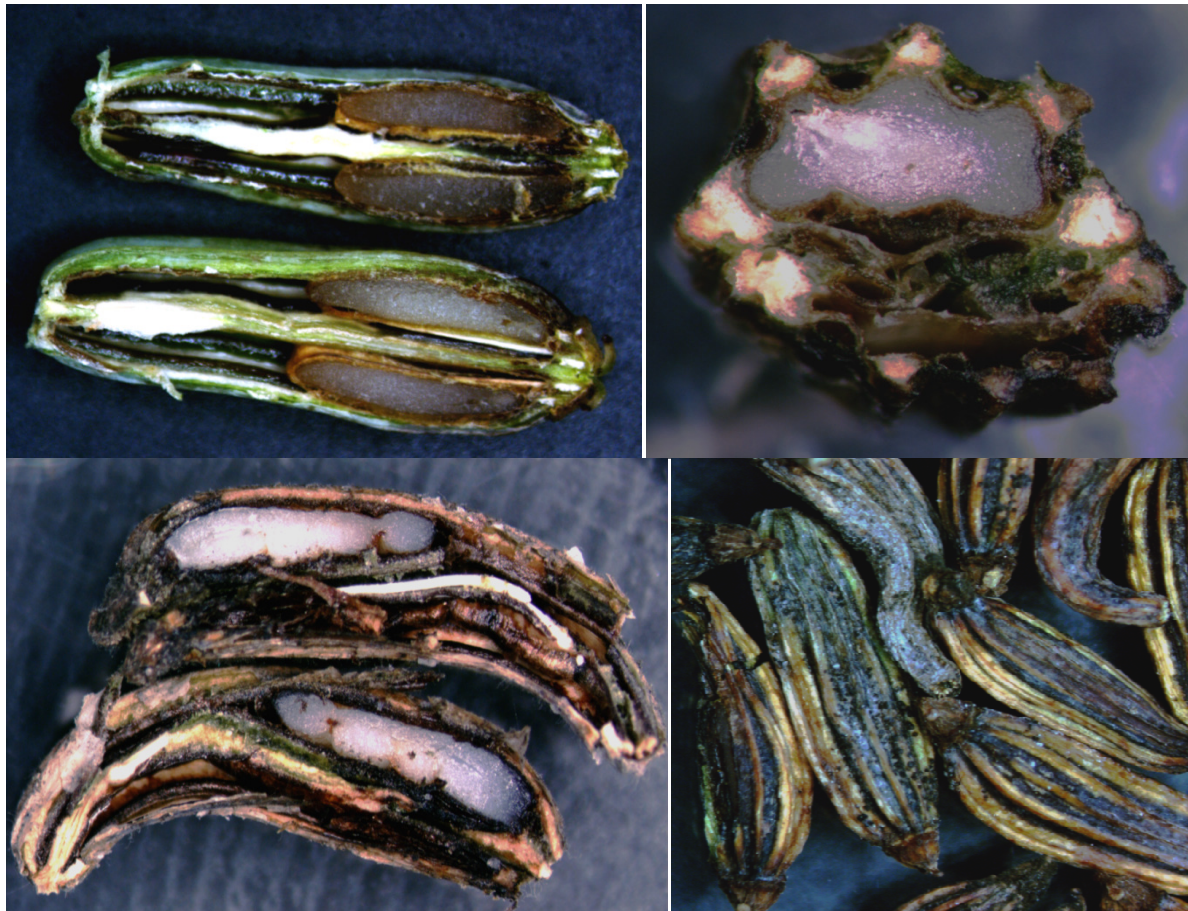


Abb. 95: Ansicht von Früchten aus einem Feld mit Totalverlust der Ernte: verbräunte Endospermkerne (Frühreife) bei grünen, unreifen Früchten (oben links); unreife Früchte (Querschnitt oben rechts) mit nur einem Endospermkern und einer leeren Fruchthülle: Längsschnitte unten links) durch Fenchel Früchte mit teilweise ausgebildeten Endospermkernen (50 % nicht ausgebildet); äußere Ansicht von vorzeitig abgeworfenen, grünen Früchten mit zahlreichen Konidienlagern auf der Oberfläche, durch die fehlenden Endospermkerne entsteht ein auffällig flacher Körper (unten rechts).

Meist kommt es, bei einer frühzeitigen Blattbesiedlung und der nachfolgenden Reduktion der Assimilatfläche, zu einer allgemeinen Schwächung der Pflanzen. Diese können dann nicht so große Dolden ausbilden, bzw. die Anzahl der Früchte wird erkennbar verringert (vorzeitiger Abfall hellgrüner Früchte), vergleichbar mit dem Junifall bei Kernobst.

Diese Erscheinung war auch in QLB in den Kleinparzellen teilweise erkennbar. Eine Erfassung des prozentualen Anteils ist aber aufgrund der Vermischung mit anderen Parametern (Wuchshöhe, Gesamtassimilatfläche Blätter, mögliche Doldengrößen) nicht möglich.

Erst ein Vergleich mit einem anderen Standort offenbart das eigentliche Ertragspotenzial der Sorten. Der Ertrag ist daher die Summe aus allen Faktoren wie Sorte, Standort-, Boden- und Witterungsbedingungen während der gesamten Vegetationsperiode. Die epidemische *M. anethi*-Befallsentwicklung stellte dabei eine zusätzliche bedeutsame Komponente dar. Bei einer optimalen Pflanzenentwicklung, trat sie in ihrer Schadwirkung wesentlich zurück. Unter suboptimalen Wuchsbedingungen könnte es zu einer allgemeinen Schwächung der Fenchelpflanzen kommen, die gleichzeitige pilzliche Entwicklung richtete mehr Schäden an als bei kräftigen Pflanzen.

Um den Pilzbefall zu verringern, sollten pflanzenbaulichen Maßnahmen so eingesetzt werden, dass möglichst starke Bestände entstehen, die hohe Erträge bringen können und dem Erreger etwas Widerstand entgegenbringen.

Bei günstigen Bedingungen für die epidemische Erregerverbreitung wären Totalverluste wahrscheinlich immer noch möglich, da die pilzliche Entwicklung sehr rasch verlaufen kann.

Eine geeignete Pflanzenschutzmittelstrategie soll im nachfolgenden Projekt für dieses Pathosystem in Zusammenarbeit mit dem Landespflanzenschutzamt in Bernburg (Frau Krusche) entwickelt werden, um Totalausfälle zukünftig verhindern zu können. Es wird erwartet, dass damit auch der Grad der pilzlichen Kontamination im Erntegut herabgesetzt werden kann.

Die durchgeführten Feldversuche waren darauf ausgerichtet, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Befallsniveau des Ausgangssaatgutes und den Ernteerträgen nachzuweisen. Dieser Zusammenhang war in diesem Pathosystem nicht gegeben. Grundsätzlich waren alle angebauten Sorten anfällig.

Nach Etablierung des Pilzes im Pflanzengewebe beeinflusste die Stärke der epidemischen Verbreitung maßgeblich den Befall der Pflanzen und der Früchte. Diese Verbreitung war an den Standorten sehr unterschiedlich und bisher nicht aktiv zu beeinflussen.

Solange das Ausgangssaatgut für Feldversuche ausgereift und keimfähig war, spielte der Grad der Vorinfektion keine nachzuweisende Rolle.

Zwei Herkünfte einer Sorte, 'Ostasia. Ursprung', zeigten größere Unterschiede zwischen Ausgangsbefall und Befall des Erntegutes.

'Ostasia. Ursprung 1 (M.B.) 8' reagierte recht einheitlich, der Fruchtbefall war vergleichsweise niedrig, trotz des starken sichtbaren Befalls an der Pflanze. Da sie sich in den Versuchen als sehr anfällig zeigte, wäre es sehr wichtig zu wissen, unter welchen Bedingungen das Saatgut erzeugt wurde, um so niedrige Kontaminationen zu erreichen (leider Firmeninterna).

Unter gleichen Vegetationsbedingungen war die Anfälligkeit der Prüfglieder zum überwiegenden Teil von Sorteneigenschaften beeinflusst. Höher wüchsige oder spät-abreifende Sorten waren deutlich weniger anfällig als frühreifende niedrig wüchsige. Das erzeugte Befallsniveau der Früchte des Erntegutes schwankte mehr oder weniger stark, je nach Spannweite der Anfälligkeit und der Standortbedingungen. Die modernen Hochleistungssorten wiesen in den Versuchen größere Befallsunterschiede auf, wahrscheinlich aufgrund ihres kompakten Wuchses, wodurch der Erregerbefall stärkere Auswirkungen auf die Blattflächen hatte.

1.3.4 Zitierte Literatur

RAEV, R. T. S., BOJADZHIEVA, B., TSALBOUKOV, P. und TOPALOVA, V. (1982): Resultaty ot selekciata na edinogodishno rezene (*Foeniculum officinale* all. var. *dulce*) - Rasteniev'edni nauki, god. Plant Science XIX, 4, 60 - 64

1.4 Einsatz der Gewebekultur zur Erzeugung unbefallener Fenchelpflanzen aus dem bestehenden Fenchelsortenspektrum

1.4.1 Einleitung

M. anethi ist hochgradig samenübertragbar und kann bisher nicht effektiv bekämpft werden. Nach unseren heutigen Kenntnissen existiert bisher kein gesichert befallsfreies Fenchelsaatgut. Alle bisher im Rahmen des Projektes untersuchten Fruchtproben (Material von Vermehrungs- und Praxisfeldern, Handelsware, Teeproben aus Apotheken und Supermärkten, Kleinproben aus Klein-, Kloster-, und Botanischen Gärten), erwiesen sich als bereits sichtbar infiziert. Auch Süß- und Knollenfenchelproben waren kontaminiert.

Die durchgeführten serologischen Untersuchungen bestätigten diese Voreinschätzung. Demnach ist der Erreger an Fenchel allgegenwärtig. Es wurde von den Projektpartnern sogar die Vermutung geäußert, die Pflanzen könnten ohne *M. anethi* nicht oder nur schwach wachsen. Um die Infektionskette von *M. anethi* an Fenchel erstmalig gezielt zu durchbrechen und die phytosanitäre Situation perspektivisch zu verbessern, sollten im Projekt erstmalig pilzfreie Pflanzen erzeugt werden, die zu definitiv gesundem Saatgut führen können.

Durch intensive Desinfektions- oder Fungizidbehandlung der Pflanzen sollte *M. anethi* in befallenen Pflanzen vollständig abgetötet werden. Die befallsfreien Pflanzen von Hochleistungssorten sollten anschließend unter sterilen Bedingungen vermehrt werden.

Die Sterilkultur von Fenchel ist seit langem eine bewährte und weltweit verbreitete Methode, die in der Fachliteratur umfangreich beschrieben ist. Hauptsächlich waren bei diesem Fremdbefruchter züchterische Probleme ausschlaggebend. Dementsprechend sind die Veröffentlichungen sehr vielfältig. Fenchel wurde zunächst für die unterschiedlichsten produktionstechnischen Problemlösungen (Erhaltung reiner Linien, Erzeugung von Linien für Hybridsaatgut, Erzeugung und Erhaltung von Pflanzen mit wichtigen Inhaltsstoffen, Erzeugung von triploiden Pflanzen) in Sterilkulturen überführt.

Nachfolgend wurde die Methode optimiert (z. B. Mediumszusammensetzungen und Hormoneinsatz zur Pflanzenvermehrung, Anregung der Blütenbildung, verbesserte Kallusbildung etc.).

Anschließend wurde er zur weiteren Verklonung sehr häufig in Gewebekultur erhalten (Mertinat et al. 1989). Die Fenchelsorte ‚Berfena‘ konnte durch Gewebekultur zwei Jahre eher zur Produktion genutzt werden als mit konventionellen Methoden. Die Feldtauglichkeit wurde bei 8000 Klonpflanzen aus Gewebekulturvermehrungen nachgewiesen und ist daher vor allem für Fremdbefruchter wie Fenchel zur Erhaltung der Hybridpartner interessant (Wilhelm 1991).

Zur Überführung der Pflanzen in die Kultur (Hunault 1981, Hunault et al. 1989, Mertinat et al. 1989), dem Einsatz von Suspensionskulturen (Hunault 1984), der Produktion von Pflanzen durch somatische Embryogenese *in vitro* und die Bedeutung von Hormonvariationen (Maheshwari und Gupta 1965, Paupardin et al. 1980, Hunault 1984, DuManoir et al. 1985, Miura et al. 1987, Hunault et al. 1989, Theiler-Hedtrich und Kägi 1991, Hunault und DuManoir 1992, Hunault und Maattar 1995, Anzidei et al. 1996, Maattar und Hunault 1997, Hunault 1997, Anzidei et al. 2000) und der Produktion von Hybridsaatgut (Theiler-Hedtrich und Kägi 1991) wurden zahlreiche Methoden der Mediumszusammensetzung diskutiert.

Erste eigene Erfahrungen zur Inkulturnahme von Fenchel lagen zu Projektbeginn bereits vor. Bei den früheren Arbeiten lag der Schwerpunkt auf der mykologischen Untersuchung von *M. anethi*, speziell der Verbesserung des Kulturwachstums und der Konidienbildung des Erregers bei Kontakt mit Pflanzenmaterial. Nachfolgend

wurden Versuche zur Dualkultur von Pilz und Pflanze durchgeführt, die die Besiedlung, Ausbreitung und Symptombildung des Mycels zum Thema hatten. In der Literatur lagen zu dieser Thematik keine Ergebnisse vor.

Im abgeschlossenen Projekt sollten die erregerefreien Pflanzen aus der Gewebekultur nach Überführung in Erdkultur zur weiteren epidemiologischen Untersuchung eingesetzt werden (z. B. räumliche Ausbreitung der Konidien innerhalb und außerhalb eines Fenchelbestandes, Bedeutung der Übertragbarkeit des Pilzes aus dem Boden, notwendige Feldabstände von Fenchel zu anderen potenziell anfälligen Kulturen). Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob steril vermehrte, befallsfreie Pflanzen den Grundstock für die Erzeugung von erregerefreien Saatgutes bilden können, d. h. ein Feldbestand bis zur Abreife gesund erhalten werden kann oder ob äußere, noch unbekannte Infektionsquellen existieren.

1.4.2 Material und Methoden

Zunächst wurden umfangreiche Voruntersuchungen zur Inkulturnahme von Fenchelpflanzen durchgeführt. Einige Methoden aus der Literatur wurden erprobt, wobei zunächst überwiegend Versuche zur Fruchtdeinfektion vorgenommen wurden, die in der Literatur sehr stark propagiert wurden. Nachfolgend wurden auch Pflanzenteile desinfiziert, wobei überwiegend die Stiele von Keimlingen verwendet wurden.

1.4.3 Ergebnisse

1.4.3.1 Desinfektionsbehandlung

Es wurden zunächst verschiedene, in der Literatur beschriebene Methoden zur Desinfektion von Früchten erprobt. Leider erwiesen sich diese Methoden als nicht praktikabel. Der Kontaminationsgrad der Früchte mit Fremdpilzen und Bakterien war bei geringer Desinfektion zu hoch bzw. die Keimung der Früchte war bei stärkerer Desinfektion nicht mehr möglich. Auch geschälte Embryonen waren entweder kontaminiert oder nicht mehr keimfähig.

In breiten Vorversuchen zur Samendesinfektion (Sorte 'Berfena') wurden Natriumhypochlorid und Sublimat erprobt, deren Konzentration und Anwendungszeit variiert wurden. Bei Samen war es fast unmöglich, alle Kontaminanten vollständig abzutöten und die Keimfähigkeit zu erhalten.

Aus diesem Grund wurden Methoden geprüft, bei der Keimlinge desinfiziert wurden. Auch hier war der Fremdpilz- bzw. der Bakterienbesatz so stark, dass kaum normal entwickelte Pflanzen für die weitere Arbeit gewonnen werden konnten. Um wüchsiges Ausgangsmaterial zu bekommen, war die vorherige Anzucht der Versuchspflanzen in Erdkultur empfehlenswerter.

Die 6 Wochen alten Keimlinge wurden ohne Blätter und Wurzeln in einer Sublimatlösung (0,1 %) für 40 - 55 min desinfiziert, zweimalig in sterilem Wasser gespült und auf MS-Medium (mit NAA Zusatz, siehe Medium), überführt. Die Umsetzung auf frisches Medium erfolgte, bei sauberen Pflanzen, zunächst im vierwöchigen Abstand. Insgesamt wurden unterschiedliche, in der Literatur empfohlene Medien geprüft. Es handelte sich um Linsmeier & Skoog und Murashige & Skoog Medien, die mit unterschiedlichen Hormonzusätzen (NAA, Kinetin, 2,4 D) und -konzentrationen eingesetzt wurden. Das beste Wachstum wurde auf MS-Medium mit NAA-Zusatz erzielt, was nachfolgend aufgeführt wurde.

Nach Abschluss dieser Vorversuche wurden 12 Wochen alte Jungpflanzen aus der Gewächshausanzucht von 4 Sorten und 4 Herkünften ('Berfena', 'Magnafena', 'Bulgare', 'Großfrüchtiger', 'Finoccio Selvatico', 'Oldenburg', 'Soroksari', 'ostasiatische Herkunft') für die Desinfektion vorbereitet. Dazu wurden jeweils nur Stängelstücke mit einem Vegetationsknoten (Wurzelhals, Stiel mit einem Knoten,

ohne Blätter ca. 4 cm Länge) abgetrennt und für 45 – 60 min (je nach Dicke der Präparate) in kleinen Bechergläsern mit 0,1 % Sublimatlösung unter Rühren desinfiziert. Die Stängelstücke wurden in kleinen Röhrchen mit dem bewährten Medium vorkultiviert. Nur sterile Stücke wurden erhalten und der sich nachfolgend bildende Kallus zerschnitten und auf neues Medium gegeben.

1.4.3.2 Mediumzusammensetzung und Kulturführung

Für die weitere Arbeit wurde ein im JKI etabliertes Medium verwendet, das sich bei der Kultur und Bewurzelung von Kartoffeln (Martina Nielitz JKI-SB) bewährt hatte (1l Aqua dest. + 4,405 g MS Medium mit Vitaminen (Duchefa), 16 g Saccharose, 6 g Phytoagar (Duchefa), 50 µl Stocklösung NAA (0,2 mg/l). Das Medium wurde auf pH 5,8 eingestellt und autoklaviert, bevor es in sterile Becher gefüllt wurde. Auf diesem Medium wurden sowohl die Kallusstücke, als auch die ersten Pflänzchen kultiviert. Die Kultur erfolgte bei 16 h Tageslicht und 20 °C. Die Kulturen wurden alle 6 bis 8 Wochen umgesetzt.

1.4.3.3 Pflanzenentwicklung und Vermehrung

Von allen Sorten konnten sterile Gewebekulturen erzeugt werden (Abb. 96), es standen zwischen 10 – 15 Einzelkalli von einer Herkunft für die Weiterkultur zur Verfügung. Bei 6 Sorten entwickelten sich bereits Pflanzen (Abb. 97), die nach ausreichender Wurzelbildung, in Erdkultur überführt werden konnten. Nach ersten Untersuchungen in der RT-PCR war das gebildete Kallusgewebe von 10 ursprünglich desinfizierten Pflanzenteilen erregerefrei. Die daraus bereits entstandenen Pflanzen waren ebenfalls nicht kontaminiert.

Der Fenchel zeigte sich ohne den Erregerbefall völlig normalwüchsig, es traten bisher keine vorzeitigen Blattverluste auf. Eine Art von Symbiose zwischen dem Pathogen und seinem Wirt scheint für die Pflanze nach ersten Beobachtungen nicht zwingend notwendig für eine gute Entwicklung zu sein.

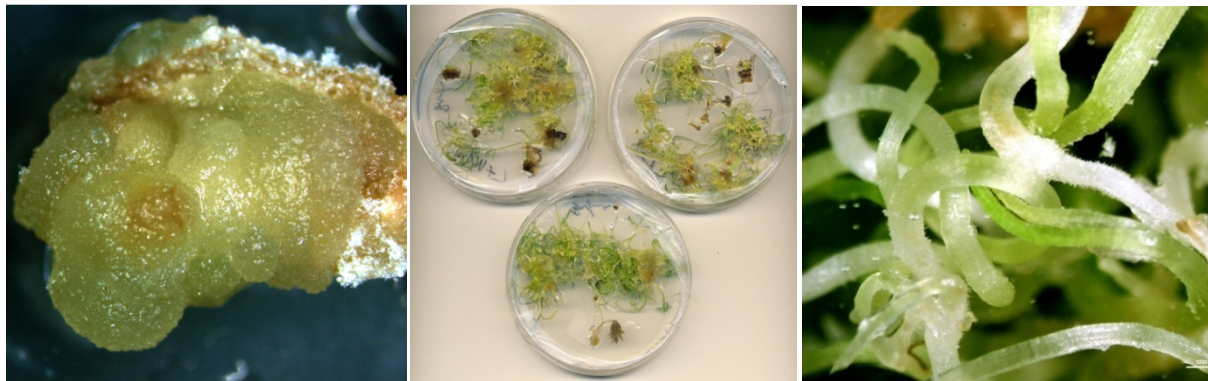


Abb. 96: Nahaufnahme eines Fenchelkallus nach 4 Monaten Regenerationswachstums nach der Desinfektionsbehandlung (links); Petrischalen (Ø 5 cm) mit erstem moosartigen Wachstum von Fenchelpflanzen (Mitte), Nahaufnahme der ersten Stiele, Blätter und Wurzeln von Fenchel (rechts).

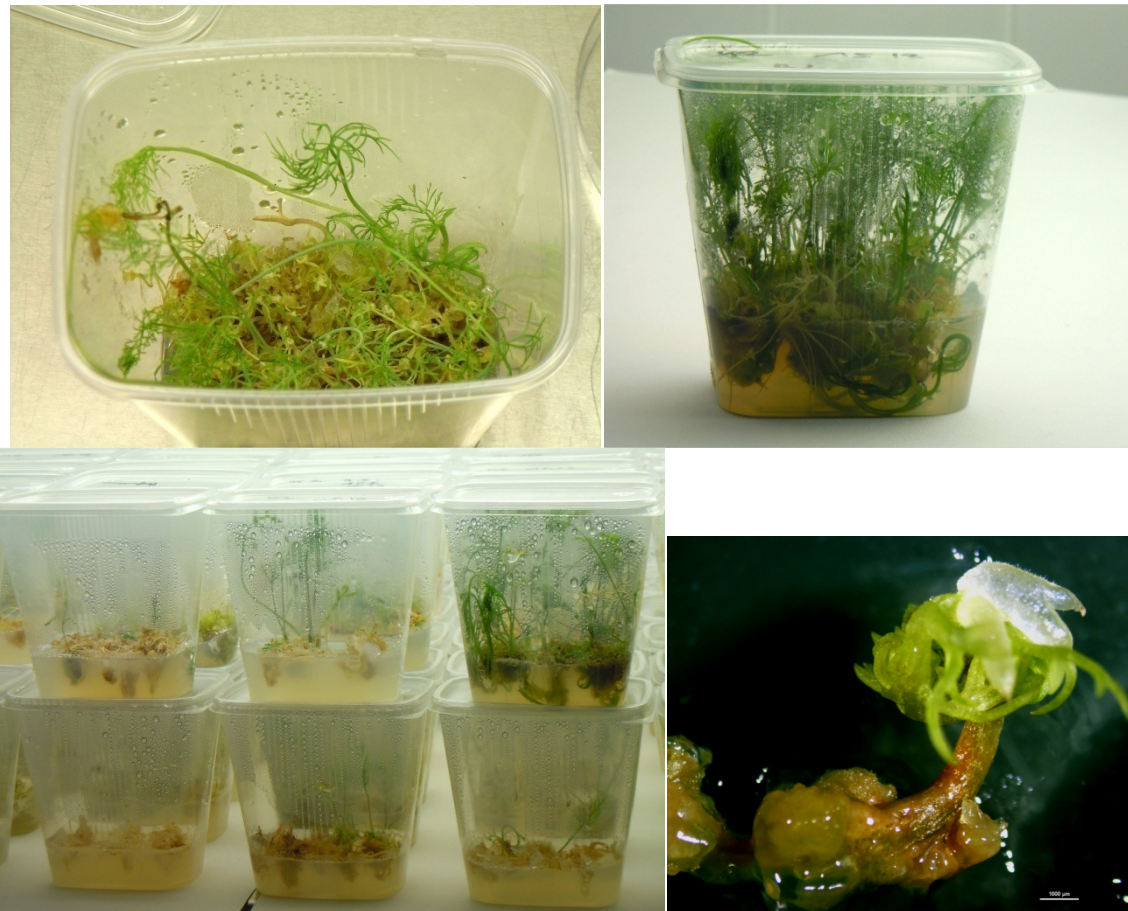


Abb. 97: Sterilkulturschalen mit Fencheljungpflanzen (oben); unterschiedliche Entwicklungsstufen von Pflanzen aus Kallusgewebe im Brutraum (unten links); Nahansicht erster Gewebedifferenzierungen aus einem Kallusstück, deutlich erkennbar ein Blattstiel mit kleiner Blattfieder.

1.4.4 Ausblick

Bisher wurden Gewebekulturen von 8 Sorten und Herkünften angelegt (Kallus, Jungpflanzen, ältere Pflanzen), die erhalten und vermehrt werden. Zahlreiche Pflanzen wurden bereits in Erdkultur überführt. Sie sollen im Gewächshaus zur Blüte gebracht werden. Bisher wurden ca. 40 Pflanzen an 5 verschiedenen Standorten im Freiland ausgepflanzt, die in diesem Jahr (2012) erste Früchte bilden werden. Diese sollen im Anschlussprojekt auf mögliche Kontaminationen untersucht werden. Im neuen Projekt sollen weitere epidemiologische Untersuchungen mit diesem Saatgut durchgeführt werden (siehe Einleitung).

1.4.5 Zitierte Literatur

ANZIDEI, M., VIVONA, L., SCHIFF, S. und BENNICI, A. (1996): *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristics in relation to morphogenesis. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 45, 263 - 268

ANZIDEI, M., BENNICI, A., SCHIFF, S, TANI, C. und MORI, B. (2000): Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61, 69 - 79

DUMANOIR, J., DESMAREST, P. und SAUSSAY, R.(1985): *In vitro* propagation of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *Scientia Horticulturae* 27, 15 - 19

- HUNAUULT, G. (1981): La culture *in vitro* des tissus de Fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.). Premières observations sur le comportement des explants primitifs et des cals. CR Acad. Sci., Paris 293: 553-558
- HUNAUULT, G. (1984): *In vitro* culture of fennel tissues (*Foeniculum vulgare* Mill.) from cell suspensions to mature plant. Sci. Hortic. 22, 55 – 65
- HUNAUULT, G. (1997): Tétraploidisation du fenouil (*Foeniculum vulgare* Miller) par application de colchicine à une suspension cellulaire embryogène. Acta bot. Gallica, 144, 1, 83 - 93
- HUNAUULT, G. und DUMANOIR, J. (1992): Micropropagation of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). Bajaj, Y. P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 19 High –Tech and Micropropagation III, 199 - 217
- HUNAUULT, G., DESMAREST, P. und DUMANOIR, J. (1989): *Foeniculum vulgare* Miller: Cell culture, regeneration and production of anethole. Bajaj, Y. P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 7, Medicinal and Aromatic Plants II, 185 – 211
- HUNAUULT, G. und MAATTAR, A. (1995): Enhancement of somatic embryogenesis frequently by gibberellic acid in fennel. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41, 171 - 176
- MAATTAR, A. und HUNAUULT, G. (1997): Influence des régulateurs de croissance sur la teneur des tissus en polyamines libres lors de l'induction de l'embryogénèse somatique chez le fenouil (*Foeniculum vulgare* Miller). C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie, 320, 245 - 251
- MAHESHWARI, S. und GUPTA, G. R. P. (1965): Production of adventitious embryoids *in vitro* from stem callus of *Foeniculum vulgare*. Planta (Berl.), 67, 384 - 386
- MERTINAT, H.; WILHELM, E. G.; HANNIG, H.- J.; DITTRICH, B. und LUCKNER, M. (1989): Die Sprossspitzenkultur – ein Verfahren zur In-Vitro-Vermehrung (Verklonung von *Foeniculum vulgare* Mill.). Drogenreport 2, 3, 39 - 48.
- MIURA, Y., FUKUI, H. und TABATA, M. (1987): Clonal propagation of chemically uniform fennel plants through somatic embryoids. Planta Med. 53(1); 92-4
- PAUPARDIN, C., GARCIA-RODRIGUEZ, M. J. und BRICOUT, J. (1980): Multiplication végétative de quelques plantes aromatiques: Problèmes posés par la production d'essence. C.R. Acad. Agric. Fr. 66 , 658-666
- THEILER-HEDTRICH, R. und KÄGI, A. C. (1991): Cloning *in vitro* and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* Mill. (Fennel) of ‚Zefa fino‘ and ‚Zefa tardo‘. Acta Hortic. 300, 287 - 291
- WILHELM, E.-G. (1991): Leistungsprüfungen *in-vitro* hergestellter Fenchelklonpflanzen (*Foeniculum vulgare* Mill.), Drogenreport 4, 6, 67 - 77

1.5 Agarplattentest zur Ermittlung der Direktwirkung von Fungiziden

1.5.1 Einleitung

Zur Wirkung von Fungiziden auf den epidemischen *M. anethi*-Befall lagen in der Literatur zahlreiche Ergebnisse aus Feldversuchen vor (Desmarest 1978, Chandhari und Patel 1987, Harvey et al. 1988, Petzoldt 1989, Petzoldt 1989, Lakra 1993, Varvaro et al. 1998, Kumar und Kumar 2001, Taubenrauch et al. 2001, Dehe et al. 2003, Odstrcilova et al. 2002, Taubenrauch 2007).

In Deutschland sind Pflanzenschutzmittel unverzichtbare Faktoren des effizienten Heil- und Gewürzpflanzenanbaus (Plescher und Stodollik 1995). Bei Kulturen mit geringem Anbauumfang stellt die Indikationszulassung ein Problem dar. Die herstellende Industrie hat durch die hohen Kosten für die Zulassung eines Pflanzenschutzmittels wenig Interesse, für Kleinkulturen eine Zulassung zu beantragen, zumal sich die Anforderungen zur Umweltverträglichkeit ständig erhöht haben. Besonders bei Fenchel und Johanniskraut gab es in jüngerer Zeit große phytosanitäre Probleme (Herold 1999, Hoppe 1999, Dehe et al. 2003). In den Jahren 1998 bis 2001 wurden von den Pflanzenschutzämtern in Rheinland-Pfalz und Sachsen-Anhalt Lückenindikationsversuche durchgeführt (Dehe et al. 2003).

Die Wirkung der Fungizide war im Vergleich zur unbehandelten Variante bei den meisten Autoren sehr deutlich zu erkennen (Chandhari und Patel 1987, Harvey et al. 1988, Lakra 1993, Petzoldt 1989, Varvaro et al. 1998). Es erfolgte meist eine Behandlung, deren Erfolg durch einen Vergleich der Erntemengen mit der Kontrolle festgestellt wurde. Durch die Behandlung wurde meist nur eine anfängliche Befallsverzögerung erzielt, ein Übergreifen auf die Samen konnte gewöhnlich nicht verhindert werden (Krusche und Mertens 2000, Koch et al. 2002).

Die Bekämpfung des Erregers wurde in der Literatur insgesamt als schwierig beschrieben. Fenchel zeigte erst kurz vor der Blüte erste Befallssymptome und war deshalb aufgrund der Pflanzenhöhe nicht mehr mit Spritzgeräten überfahrbar. Hinzu kamen Probleme mit Wirkstoffrückständen, die von den Pflanzen bevorzugt in den ölhaltigen Früchten eingelagert wurden. Eine Bekämpfung mit Fungiziden sollte deshalb grundsätzlich frühzeitig durchgeführt werden, am besten vor dem Auftreten der Symptome. Dies war aber bisher in der Praxis nicht üblich, zumal diese Vorgehensweise den Grundsätzen des integrierten Pflanzenschutzes widersprach.

Meist wurde das Saatgut für die Versuche gedrillt, eine Abgrenzung der Parzellen oder Varianten zur Verhinderung des Konidienflugs zwischen den Varianten bestand nicht.

Bisher wurde die direkte Fungizidwirkung auf das Pilzmycel nicht ermittelt, da der Erreger als nicht kultivierbar auf künstlichen Medien galt und daher nicht in ausreichender Menge isoliert und vermehrt werden konnte.

Durch die Vermehrung der Reinkulturen zur mykologischen Untersuchung und zur Anlage einer Isolatesammlung lagen nun erstmals ausreichende Mycelmengen vor, um die Direktwirkung der Fungizide zu untersuchen. Die überwiegende Anzahl der getesteten Fungizide ist bisher nicht zur Bekämpfung des Erregers im Fenchelanbau zugelassen. Die Anwendung erfolgte ausschließlich im Labor an Pilzkulturen. Die Versuche müssen daher als Vorversuche eingestuft werden und erlauben keine Rückschlüsse auf eine Befallsreduzierung bei Pflanzen.

1.5.2 Material und Methoden

Zur Ermittlung der direkten Fungizidwirkung in einem Agarplattentest wurden 14 Fungizide (Tab. 7) auf ihre Eignung zur Wachstumsunterdrückung bzw. Abtötung von *M. anethi* getestet.

Tab. 7: Eingesetzte Fungizide im Agarplattentest.

	Pflanzenschutzmittel	Wirkstoff	Zulassung im Fenchel
1	Askon	Azoxystrobin / Difenconazol	vorgesehen
2	Luna Experience	Tebuconazol + Fluopyram	
3	Cantus	Boscalid	
4	Cantus Gold	Boscalid / Dioxystrobin	
5	Caramba	Metconazol	
6	Cuprozin	Kupfer	Ja
7	Flamenco FS	Prochloraz / Fluquinconazol	
8	Folicur	Tebuconazol	Ja
9	Forum	Dimethomorph	vorgesehen
10	Input	Spiroxamine / Prothioconazol	
11	Ortiva	Azoxystrobin	Ja
12	Score	Difenconazol	Ja
13	Signum	Boscalid / Pyraclostrobin	
14	Thiovit Jet	Schwefel	Ja

Für die Herstellung des Nährbodens für die Platten wurden die Fungizide (Tab. 7) in zwei Konzentrationsstufen (50 und 500 ppm) zu einer autoklavierten Kartoffeldextroseagarlösung (KDA) gegeben. Unter der Sterilbank wurden die Fungizidlösungen in Petrischalen (Ø 5 cm, je 10 ml) gegossen. Nach dem Erkalten der Agarmischung wurde eine mit sterilem Aqua dest. gemörserte Mycelsuspension von *M. anethi* (200 µl) mit der Pipette auf die Agaroberfläche gegeben. Pro Variante wurden 10 Platten hergestellt. Als Kontrollvariante wurden KDA-Platten verwendet, die normalerweise zur Kulturvermehrung verwendet werden.

Die erste Bonitur des Mycelwachstums erfolgte nach 8 Wochen. Die Versuche wurden zweimalig mit unterschiedlichen Mycelmischungen durchgeführt, um eventuelle Wüchsigkeitsunterschiede zwischen den Pilzherkünften auszuschließen. Jede Platten einer Variante wurde einzeln mit Hilfe eines Boniturschemas bewertet (Abb. 98).

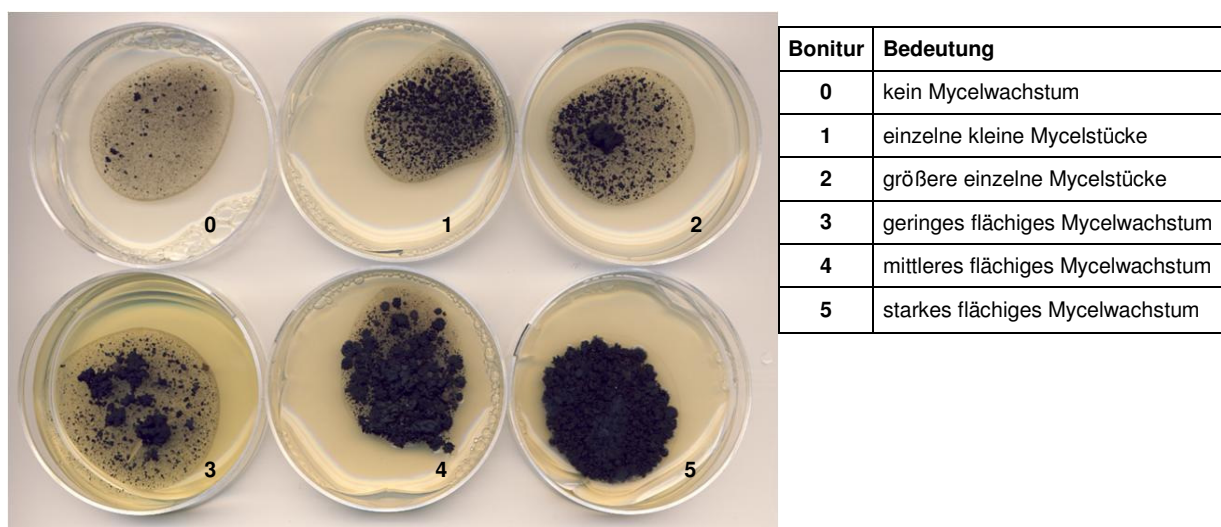


Abb. 98: Boniturschema zur Einstufung des *M. anethi*-Wachstums auf Agarplatten.

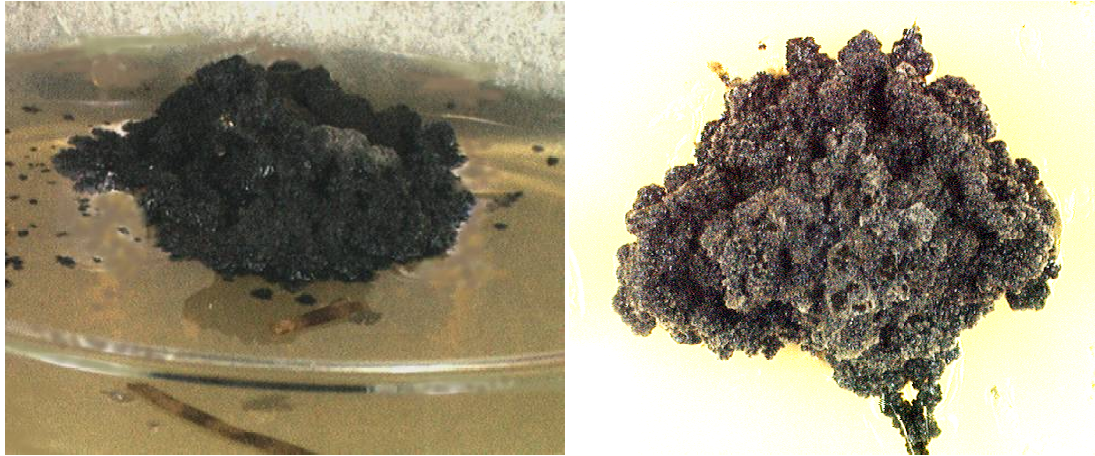


Abb. 99: Kennzeichen einer wüchsigen *M. anethi*-Kultur nach ca. 4 Monaten Wachstum (links Seitenansicht, rechts Aufsicht) ist ein erhabenes, festes, schwarzes Mycel, welches auf der Oberfläche kristalline, weißliche Hyphen ausbildet.

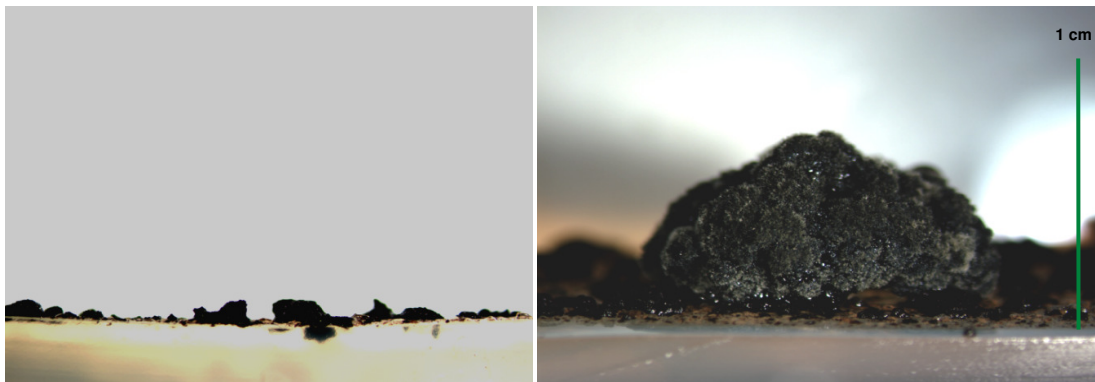


Abb. 100: Vergleichende Seitenansicht von *M. anethi*-Mycel: nach der Auftragung auf den Agar (links) und nach 8 Wochen Wachstum (rechts).

1.5.3 Ergebnisse

Das übliche Wachstum von *M. anethi* auf KDA (Abb. 99) war recht charakteristisch. Innerhalb der Kultivierung auf den Platten kam es in einigen Varianten zu einer größeren Mycelvermehrung (Abb. 100). Der erste Fungizidversuch wurde nach 8 Wochen Standzeit ausgewertet (Abb. 98 und 101).

Das *M. anethi*-Mycelwachstum wurde durch den Fungizidzusatz von ‚Askon‘, ‚Luna Experience‘, ‚Cantus‘, ‚Cantus Gold‘, ‚Flamenco FS‘, ‚Folicur‘, ‚Input‘, ‚Ortiva‘, ‚Score‘ und ‚Signum‘ vollständig verhindert. Das Mycel konnte nicht in die Agaroberfläche einwachsen und ließ sich problemlos wieder von der Oberfläche abwischen. Die Variante ‚Caramba‘ wies vereinzelte Mycelstücke auf, die sich deutlich vergrößert hatten. Sie waren im Gegensatz zu dem übrigen Mycel fest mit dem Agar verwachsen und ohne Gewebezzerstörung nicht mehr zu entfernen. Bei der höheren Konzentration waren sogar drei Platten mit dieser Wuchsform zu finden. Hier stimulierte offenbar die höhere Konzentration das Wachstum des Mycels besser als die niedrigere. Bei ‚Cuprozin‘ ermöglichte die geringere Konzentration ein sehr gutes flächiges Mycelwachstum, vergleichbar der Kontrollvariante. Die höhere Konzentration führte bei drei Platten zum Wachstum einzelner größerer Mycelstücke.

Die Fungizidwirkung war bei ‚Forum‘ mit ansteigender Konzentration besser, hier waren größere Mycelstücke bei drei Platten der niedrigen und eine der höheren

Mittelkonzentration gewachsen. ‚Thiovit Jet‘ bewirkte bei der niedrigen Konzentration des Mittels bei vier Platten ein stückiges und bei drei Platten sehr gutes flächiges Wachstum des Mycels. Bei allen Platten der höheren Konzentration trat Wachstum einzelner Mycelstücke auf.

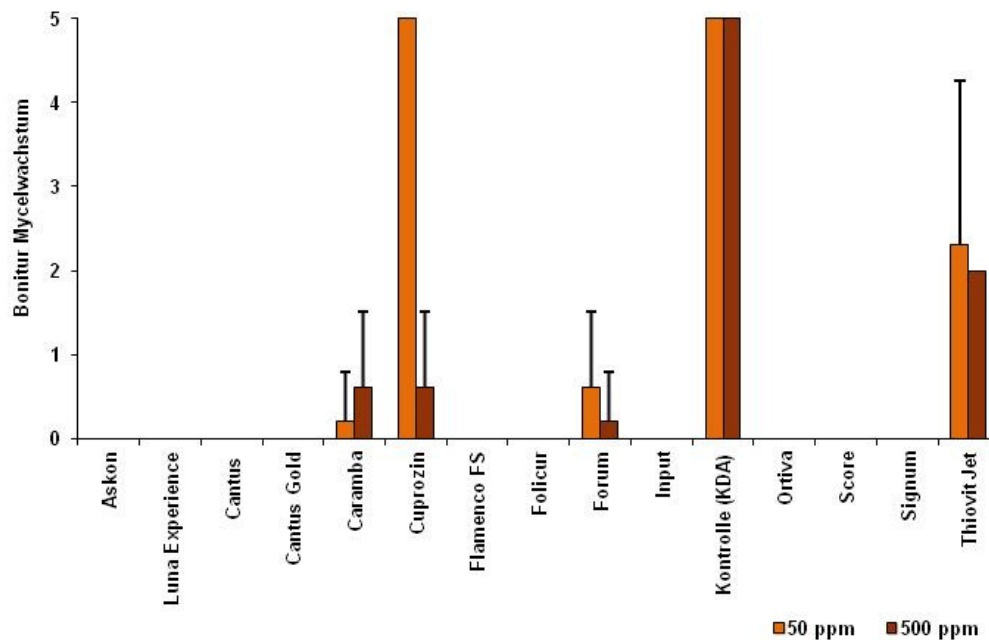


Abb. 101: Erster Agarplattentest zur Wirkung von 14 Fungiziden auf das *M. anethi*-Mycelwachstum (Boniturnote: 0 = kein Mycelwachstum, 1 = einzelne kleine Mycelstücke sichtbar, 2 = größere einzelne Mycelstücke sichtbar, 3 = geringes flächiges Mycelwachstum, 4 = mittleres flächiges Mycelwachstum, 5 = starkes flächiges Mycelwachstum).

Es ergab sich die Frage, ob die Fungizidwirkung bei einer längeren Standzeit der Platten im Agar nachlässt. Es wurden deshalb 8 Wochen alte Fungizid-haltige KDA-Platten mit *M. anethi*-Mycel beimpft und nach weiteren 8 Wochen bonitiert (Abb. 103). ‚Askon‘, ‚Cantus‘, ‚Cantus Gold‘, ‚Caramba‘, ‚Flamenco FS‘, ‚Folicur‘, ‚Input‘, ‚Score‘ und ‚Signum‘ konnten das Erregerwachstum wiederum sehr gut verhindern. Im Vergleich zum ersten Versuch zeigte sich bei ‚Luna Experience‘ bei einer Platte ein größeres wüchsiges Mycelstück. ‚Cuprozin‘ erwies sich in der niedrigen Konzentration wieder als nicht wirksam, bei stärker Konzentration waren auf allen Platten einzelne größere Mycelstücke erkennbar. Im Vergleich zum frischen Agar wurde hier eine Wirkungsverringerung deutlich. Bei ‚Forum‘ konnten in der niedrigen Konzentration 8 Platten mit Mycelstücken bonitiert werden, ebenfalls eine nachlassende Wirkung im Vergleich zum ersten Versuch. ‚Ortiva‘ zeigte im Agarplattenversuch bei längerer Standzeit eine eingeschränkte Wirkung. Hier waren bei vier Platten der niedrigen Konzentration sehr geringe Mycelzuwüchse erkennbar und bei allen Platten der höheren Konzentration einzelne Mycelstücke. ‚Thiovit Jet‘ zeigte ebenfalls eine nachlassende Wirkung, jetzt war bei 10 bzw. 8 Platten sehr gutes Mycelwachstum erkennbar.

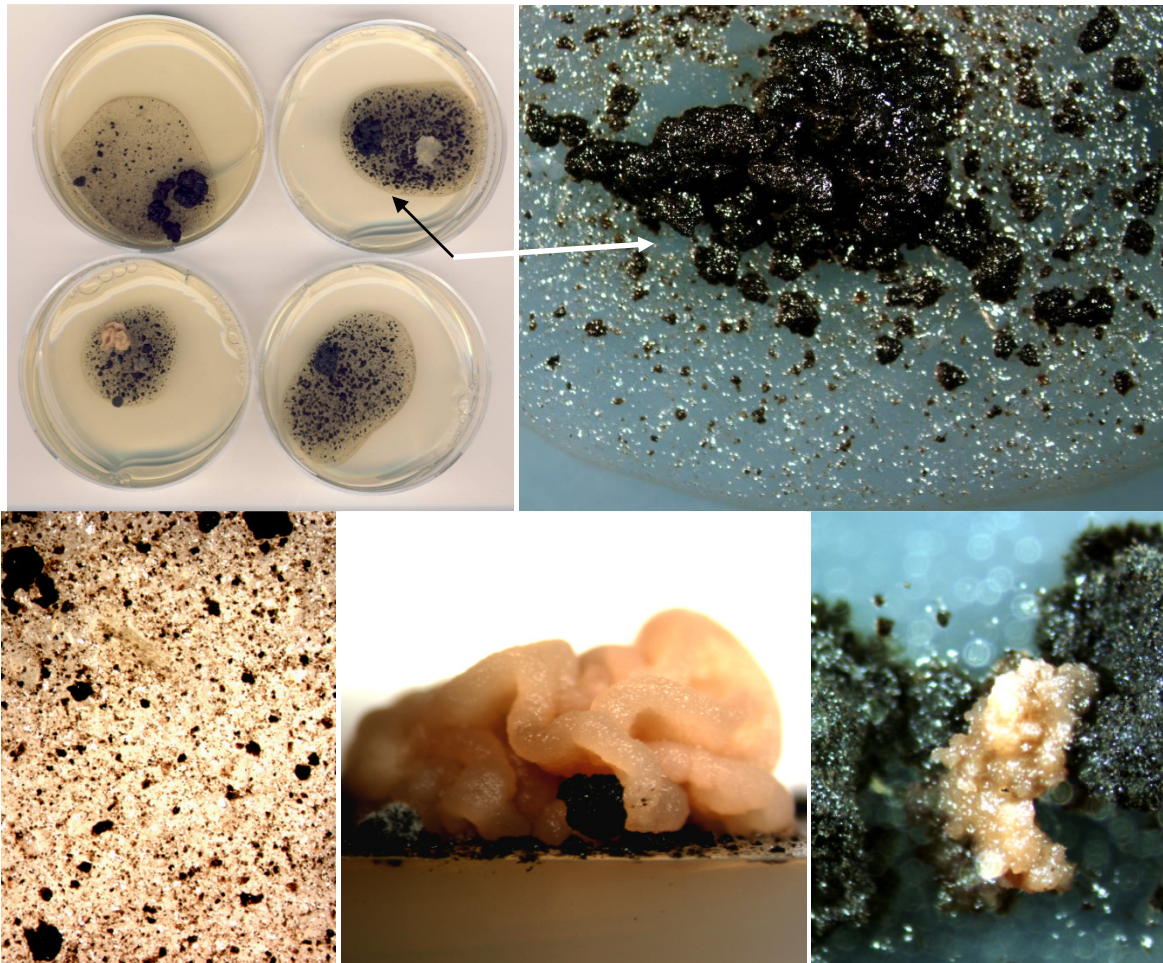


Abb. 102: Stückiges Mycelwachstum auf den Platten (oben links) und Nahansicht des Mycels, was sich an einigen Stellen als sehr wüchsig erwies (Aufsicht rechts oben, Pfeil). Andere Bereiche zeigten kein Wachstum (Aufsicht links unten). Einige Mycelstellen wuchsen so rasch, dass gelbliches Gewebe entstand (Seitenansicht Mitte unten), welches sich erst später dunkel verfärbte (rechts unten).

Bei einer Versuchswiederholung wurden ausgewählte Fungizidvarianten erneut getestet, dieses Mal mit einer anderen Pilzisolatemischung von *M. anethi* (Abb. 104). ‚Askon‘ und ‚Luna Experience‘ konnten das Wachstum wiederum völlig unterbinden. Der ‚Caramba‘-Zusatz ermöglichte überall ein geringes Mycelwachstum, bei der niedrigen Konzentration wiesen vier Platten und bei der höheren sogar 7 Platten größere Mycelstücke auf. Bei ‚Flamenco FS‘ wiesen drei Platten ein geringes flächiges Mycelwachstum in der höheren Konzentration und bei ‚Forum‘ 8 Platten bei der niedrigeren Konzentration auf. Bei ‚Cuprozin‘ und ‚Thiovit Jet‘ war keine Wachstumsbeeinträchtigung des Mycels festzustellen, es entwickelte sich genau wie bei der KDA-Kontrollvariante.

Zur Überprüfung der tatsächlichen Mycelvitalität (Abb. 105 und 106) des nicht gewachsenen, d. h. anscheinend abgetöteten Mycels aller Varianten aus dem ersten Versuch, wurden von Platten der höheren Fungizidkonzentration (500 ppm) Mycelüberimpfungen auf KDA vorgenommen. Nur das „abgetötete“ Mycel in der ‚Cuprozin‘ Variante war noch vital und entwickelte sich bei allen KDA-Platten zu größeren Mycelstücken.

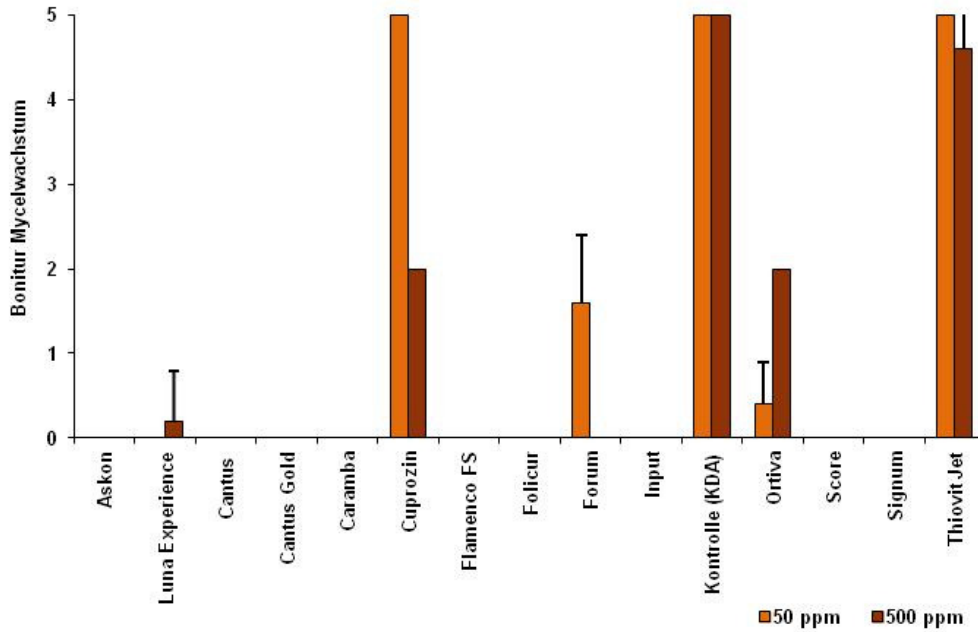


Abb. 103: Agarplattentest zur Wirkung von 14 Fungiziden auf das *M. anethi*-Mycelwachstum mit Erfassung der **zeitlichen Wirkungsverminderung** (Boniturnote: 0 = kein Mycelwachstum, 1 = einzelne kleine Mycelstücke sichtbar, 2 = größere einzelne Mycelstücke sichtbar, 3 = geringes flächiges Mycelwachstum, 4 = mittleres flächiges Mycelwachstum, 5 = starkes flächiges Mycelwachstum)

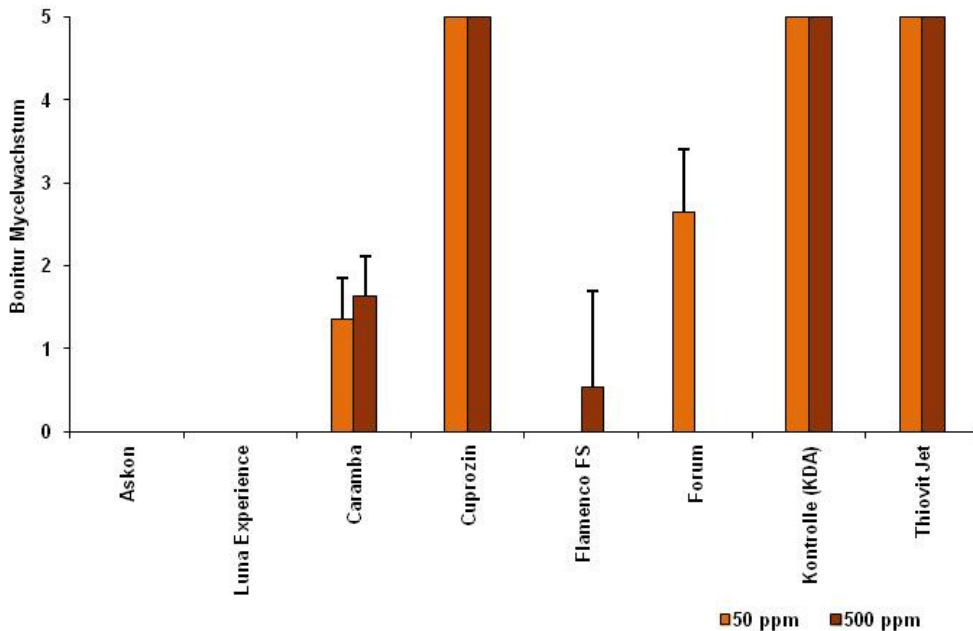


Abb. 104: Zweiter Agarplattentest zur Wirkung von 14 Fungiziden auf das *M. anethi* – Mycelwachstum (Boniturnote: 0 = kein Mycelwachstum, 1 = einzelne kleine Mycelstücke sichtbar, 2 = größere einzelne Mycelstücke sichtbar, 3 = geringes flächiges Mycelwachstum, 4 = mittleres flächiges Mycelwachstum, 5 = starkes flächiges Mycelwachstum)

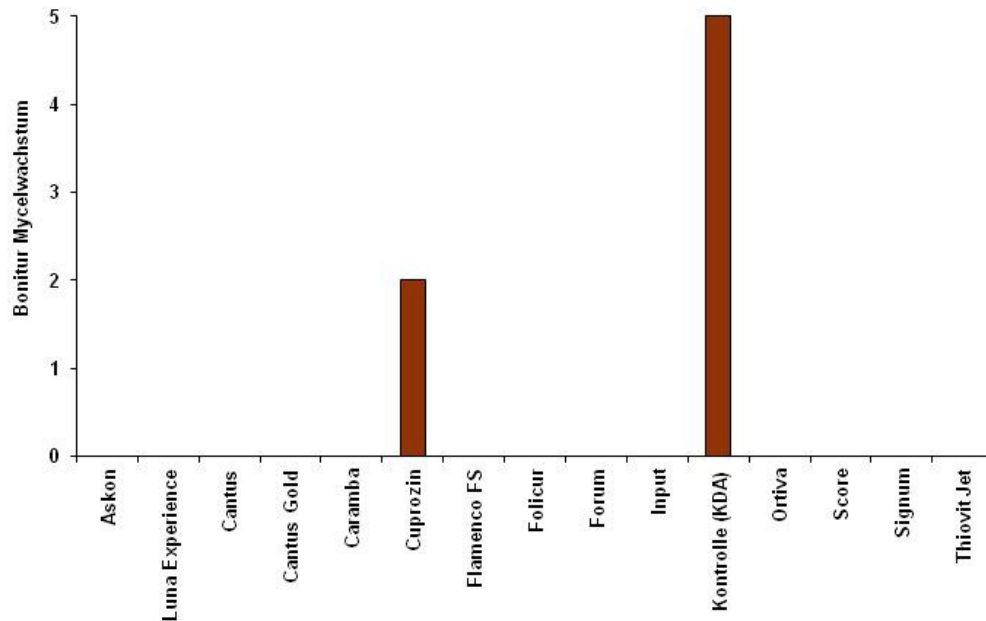


Abb. 105: KDA-Agarplattentest zur Vitalitätsprüfung von nicht gewachsenem Mycel in 14 Fungizidvarianten (y-Achse) nach Überimpfung auf KDA (Boniturnote: 0 = kein Mycelwachstum, 1 = einzelne kleine Mycelstücke sichtbar, 2 = größere einzelne Mycelstücke sichtbar, 3 = geringes flächiges Mycelwachstum, 4 = mittleres flächiges Mycelwachstum, 5 = starkes flächiges Mycelwachstum).

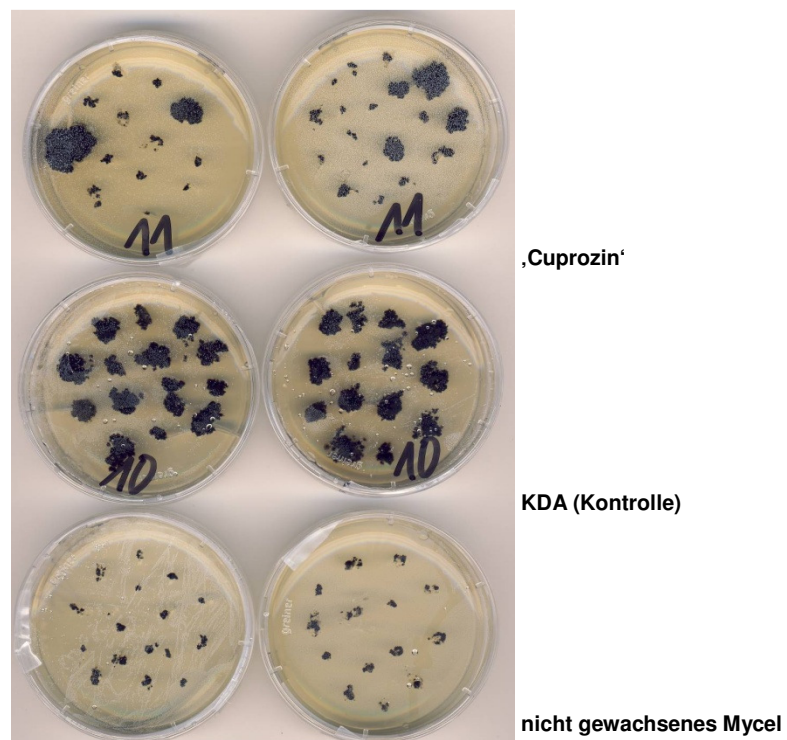


Abb. 106: Unterschiede im Mycelwachstum zwischen ,Cuprozin' (oben) und KDA (Mitte) -Platten im Vergleich zu „nicht gewachsenem Mycel“ anderer Varianten.

Zur Testung der gewachsenen Mycelstücke (aus dem ersten Versuch) auf Resistenzen gegenüber dem jeweiligen Fungizid wurde das wüchsige Mycel von den Platten (beide Konzentrationen) abgenommen, gemörsert und als wässrige Suspension erneut auf den Fungizidagar gegeben, auf dem sie gewachsen waren (Abb.

107). Als Kontrolle für jede Mycelvariante dienten KDA-Platten. Wie zu erwarten, war das Wachstum bei allen KDA-Kontrollen sehr gut.

Bei ‚Askon‘, ‚Luna Experience‘, ‚Caramba‘ und ‚Flamenco FS‘ konnte kein erneutes Kulturwachstum nachgewiesen werden, die Mycelstücke reagierten weiterhin empfindlich auf den Wirkstoff. Bei ‚Cuprozin‘ und ‚Thiovit Jet‘ zeigte sich keine Wuchsbeeinträchtigung, alle Platten waren flächig dicht bewachsen.

Bei ‚Forum‘ wiesen alle Platten ein geringes bis mittleres flächiges Mycelwachstum auf, hier zeigte sich im Vergleich zur ersten Anwendung eine höhere Unempfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff Dimethomorph.

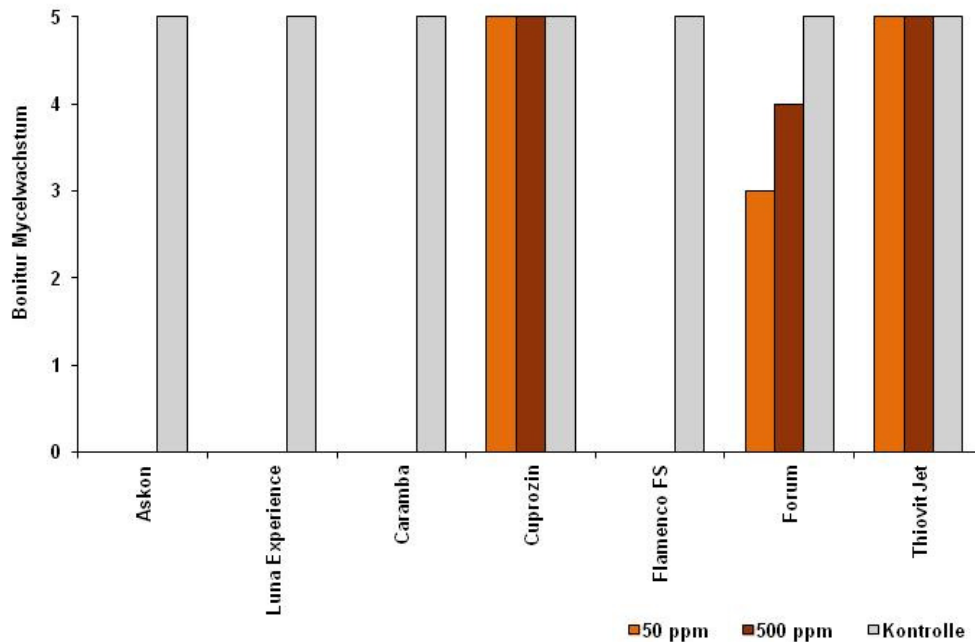


Abb. 107: Untersuchung des Verhaltens wüchsiger *M. anethi*-Mycelstücke von Fungizid-haltigen KDA-Platten in einem zweiten Agarplattentest zur Wirkung von 14 Fungiziden (Boniturnote: 0 = kein Mycelwachstum, 1 = einzelne kleine Mycelstücke sichtbar, 2 = größere einzelne Mycelstücke sichtbar, 3 = geringes flächiges Mycelwachstum, 4 = mittleres flächiges Mycelwachstum, 5 = starkes flächiges Mycelwachstum).

1.5.4 Zusammenfassung

Als Ergebnis dieser Untersuchungen stehen mit ‚Askon‘, ‚Luna Experience‘, ‚Cantus‘, ‚Cantus Gold‘, ‚Flamenco FS‘, ‚Folicur‘, ‚Input‘, ‚Ortiva‘, ‚Score‘ und ‚Signum‘ grundsätzlich mehrere potenzielle Mittel zur Abtötung des Erregers zur Verfügung.

Diese Ergebnisse erlauben allerdings keine Rückschlüsse auf die Wirkung der Fungizide auf einen pilzbefallenen Feldbestand. Hier kann es durchaus zu völlig abweichenden Resultaten kommen. So zeigte sich das im Agarplattentest wirkungsvolle und im Fenchelanbau zugelassene Mittel ‚Ortiva‘ bei einer Pflanzenbehandlung auf dem Feld zwar als wirkungsvoll zur Reduktion der Sekundärinfektionen, das Mittel konnte den Erreger aber nicht völlig abtöten. Die Früchte wurden trotzdem infiziert, da die Sekundärinfektionen nur zeitweilig unterbunden wurden.

Fenchelbehandlungen mit ‚Folicur‘ (keine Zulassung für Fenchel) lieferten ähnliche Ergebnisse. In früheren Versuchen mit ‚Folicur‘ wurde von uns eine gute Wirkung zur Verminderung und Verzögerung des Befalls während der epidemischen Phase des Erregers ab dem Blühbeginn beobachtet. Bei den gespritzten Parzellen waren nur geringe Blattschädigungen durch Konidienlager erkennbar. Völlige Befallsfreiheit der

Pflanzen konnte dennoch nicht erreicht werden, die Früchte wurden trotzdem infiziert.

Die untersuchten Fungizide sollen im nächsten Projekt, nach Etablierung der RT-PCR, im Feldversuch bei Jungpflanzen angewendet werden. Der latente Befall von *M. anethi* soll anschließend in Blattproben quantifiziert werden, um Hinweise auf die Fungizidwirkung in vivo zu erhalten.

1.5.5 Zitierte Literatur

CHANDHARI, S. M. und PATEL, A. J. (1987): Chemical control of *Alternaria* Blight and *Ramularia* Blight of Fennel (*Foeniculum vulgare*). Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 17, 348 - 350

DEHE, M., FROSCH, M., GROHS, B.-M., KRUSCHE, M. und REICHARDT, I. (2003): Untersuchungen zur Kontrolle akuter Doldenerkrankungen des Fenchels durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Z. Arzn. Gew. Pfl. 8, 79 - 82

DESMAREST, P. (1978): New aspects of fennel cultivation in France. Acta Horticulturae 73, 289 - 295

HARVEY, I. C., WELSH, R., PORTER, N. G. und HAMBLIN, H. (1988): Essential oil yields from blighted fennel. New Zealand Weed and Pest Control Conference 41, 96 - 98

HEROLD, H. (1999): Lückenindikation in Arznei- und Gewürzpflanzen - spezielles Problem? Gemüse 3, 183 - 184

HOPPE, B. (1999): Einheimischer Arznei- und Gewürzpflanzenanbau weiter im Aufwind. Gemüse 5, 315 - 316

KOCH, W., HELLER, W. und HESS, E. (2002): Erstmals Fungizid bei Fenchel zugelassen. Fenchelkrankheiten stellen Produktion vor neue Herausforderung. Der Gemüsebau / Le Maraicher 7, 4 - 7

KRUSCHE, M. und MERTENS, K. (2000): Stand der Arbeiten und Ergebnisse der Tätigkeit des Unterarbeitskreises Lückenindikation Arznei- und Gewürzpflanzen im Frühjahr 2000. Z. Arzn. Gew. Pfl. 5, 165 - 167

KUMAR, B. und KUMAR, S. (2001): Seed mycoflora of fennel their effect and control. Annals of Biology 17, 83 - 86

LAKRA, B. S. (1993): Epidemiology and management of *Ramularia* blight of fennel (*Foeniculum vulgare* L.). Indian J. Mycol. Pl. Pathol. 23, 70 - 77

ODSTRCILOVA, L., ONDREJ, M., KOCOURKOVA, B., RUZICKOVA, G., TABORSKY, V., POLAK, J., LEBEDA, A. und KUDELA, V. (2002): Monitoring of incidence and determination of fungi on caraway, fennel, coriander and anise, consideration of disease importance and possibility of chemical protection. Plant Protection Science 38, 340 - 343

PETZOLDT, S. (1989): Zur Biologie und Schadwirkung des Erregers der Blatt- und Stengelanthraknose (*Mycosphaerella anethi* Petr.) am Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) - 1. Mitteilung; Drogenreport 3, 49 - 65

PLESCHER, A. und STODOLLIK, A. (1995): Tendenzen im Pflanzenschutz bei nachwachsenden, pharmazeutisch genutzten Rohstoffen. Drogenreport 8, 28 - 31

TAUBENRAUCH, K., GABLER, J., RABENSTEIN, F., PANK, F. und HAU, B. (2001): Erste Ergebnisse zur Sortenanfälligkeit von Arzneifenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) gegenüber *Mycosphaerella anethi* Petr.. Z. Arzn. Gew. Pfl. 6, 120 - 124

VARVARO, L., SANTINI, L. und BALESTRA, G. M. (1998): I principali parassiti nelle colture di finocchio L.. Informatore Agrario 54, 47 - 50

1.6 Sammlung von *M. anethi*-Isolaten und erste Untersuchungen zu möglicher genetischer Diversität des Erregers

1.6.1 Einleitung

Die mykologischen und epidemiologischen Kenntnisse über *M. anethi* sind noch äußerst begrenzt, bedingt durch die besonderen biologischen Eigenschaften und die sehr schwierige experimentelle Handhabung des Erregers.

Zur Verbreitung, Übertragung, Rassenbildung, Pathogenität von Stämmen und der genetischen Diversität von Isolaten liegen bisher noch keine Untersuchungen in der Literatur vor. Vergleichende systematische Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener Isolate an Fenchel, Dill und anderen potenziellen Wirtspflanzen wurden bisher nicht durchgeführt.

Zur genetischen Variabilität bzw. Diversität von *M. anethi*, der lange Zeit als nicht auf künstlichen Medien kultivierbar galt, sind in der Literatur keine Angaben vorhanden. Im Hinblick auf die Schaffung methodischer Voraussetzungen für eine Resistenzzüchtung bei Fenchel ist die Kenntnis der Pathogenitäts- bzw. Virulenzeigenschaften des Inokulums von großer Bedeutung. Bisher wurde angenommen, dass die sexuelle Vermehrung, d. h. die genetische Neukombination bei *M. anethi* in unserem Klima keine Rolle spielt, da selten ausdifferenzierte Fruchtkörper (Perithezien) gefunden wurden (Petzoldt 1989 und 1990). Dieser Sachverhalt muss überprüft und vor dem Hintergrund der sich vollziehenden klimatischen Veränderungen neu bewertet werden.

Neben dem Aspekt der Verbreitung der Krankheit durch infiziertes Saatgut, muss geprüft werden, inwieweit sich einige epidemiologische Fragen mit der vorhandenen Isolatesammlung klären lassen (u. a. Diversität bzw. Rassenspektrum an Samenherkünften, Vorkommen aggressiverer Rassen aus Hauptanbaugebieten).

1.6.2 Material und Methoden

Die molekularbiologischen Arbeiten zu diesem Themengebiet wurden am JKI in Braunschweig, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, durchgeführt und von Frau Prof. Dr. Kornelia Smalla betreut. Flavia Dematheis betreute die Durchführung dieser ersten molekularbiologischen Arbeiten zu dieser Thematik bei diesem Erreger.

1.6.2.1 Anlage einer Isolatesammlung

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchung der genetischen Diversität wurde zunächst eine Isolatesammlung von *M. anethi* angelegt bzw. die bereits existierende Kollektion um aktuelle Isolate ergänzt. Da sich *M. anethi* auf künstlichen Medien nur extrem langsam entwickelte, war die Anlage reiner Isolate experimentell sehr anspruchsvoll und zeitaufwändig. Da aus befallenen Fenchel Früchten keine saubere Kultur zu gewinnen war, musste der natürliche Befall im Sommer abgewartet werden. Die Isolategewinnung gelang hier aus Blattmaterial mit Konidienlagern deutlich besser, wenn auch nur bei ca. 4 % der desinfizierten Blattstücke (Abb. 105).

Ab Vorlage der Reinkultur dauerte es ca. 6 Monate, um 0,1 g getrocknetes Mycel zu erzeugen. Diese Menge war dann ausreichend für eine einzige DNA-Extraktion (Gesamtvolumen der DNA-Probe = 50 µl), die 10 PCR-Ansätze mit den neu entwickelten Primern bzw. ITS-Primern ermöglichte. Zunächst wurden 30 Isolate verwendet, die aus unterschiedlichen Anbaugebieten in Deutschland stammten. Die Umsetzung der Isolate erfolgte regelmäßig, um ausreichende Mycelmengen zur DNA-Gewinnung zu erzeugen.

1.6.2.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit dem „FastDNA Spin Kit for Soil“ (MP Biomedicals) nach Protokoll durchgeführt. Auch bei diesem Kit mussten 0,4 g frisches Mycel eingesetzt werden, um eine messbare DNA-Menge nach der Extraktion zu erhalten. Zur Homogenisierung des Mycels wurde eine Kugelmühle eingesetzt. Die Reinigung der DNA erfolgte mit dem „GeneClean Spin Kit“ (MP Biomedicals). Die DNA-Menge wurde auf einem 1,5%igem TBE Agarosegel bewertet.

1.6.2.3 PCR mit ITS-Primern

Zur Untersuchung erster genetischer Unterschiede zwischen *M. anethi*-Isolaten wurden die ITS-Primer 1F und 4 sowie NS1 und EF3, verwendet. Zusätzlich wurden die PCR Produkte enzymatisch mit Hinfl geschnitten, um eine weitere Differenzierung erkennen zu können.

1.6.2.3.1 Primer ITS 1F und ITS 4

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 25 µl und beinhaltete: 9,36 µl TdW, 2,5 µl 10x Puffer, 2,5 µl 2 mM dNTPs, 3,75 µl 25 mM MgCl₂, 0,8 µl DMSO, 0,5 µl Primer ITS 1F, 0,5 µl Primer ITS 4, 0,125 µl Taq-Polymerase sowie 5 µl DNA Zusatz. Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 5 min bei 95 °C, dann 35 Zyklen bei 95 °C für 30 s; Annealing 30 s bei 55 °C; Polymerisation bei 72 °C für 45 s und bei der letzten Reaktion 72 °C für 10 min. 10 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen.

1.6.2.3.2 Primer NS1 und EF3

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 25 µl und beinhaltete: 10,0 µl TdW, 2,5 µl 10x Puffer (Stoffelfragment), 2,5 µl 2 mM dNTPs, 3,75 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl DMSO, 0,5 µl Primer NS1, 0,5 µl Primer EF3, 0,2 µl Taq-Polymerase Stoffelfragment sowie 5 µl DNA Zusatz. Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 8 min bei 94 °C, dann 25 Zyklen bei 94 °C für 30 s; Annealing 45 s bei 51 °C; Polymerisation bei 72 °C für 3 min und bei der letzten Reaktion 72 °C für 10 min. 10 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde auch hier ein Enzymverdau mit Hinfl durchgeführt.

1.6.2.3.3 Enzymverdau mit Hinfl

Von sieben ausgewählten Proben der PCR-Reaktion mit den Primern ITS 1F und ITS 4, die deutliche Unterschiede aufwiesen (Probennummer 1, 3, 6, 8, 9 13, 15), wurde die DNA mit dem Enzym Hinfl geschnitten. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 25 µl, bestehend aus: 6,5 µl TdW, 2,50 µl 10x enzzymspezifischer Puffer, 1,0 µl Hinfl, 15,0 µl PCR-Produkt aus der vorangegangenen PCR-Reaktion. Die Proben wurden für 2 h bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert und die Reaktion abschließend in einem 65 °C heißen Wasserbad gestoppt. Je 10 µl der Produkte wurden auf ein 1,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen.

1.6.2.4 BOX-PCR

Bei der BOX-PCR-Reaktion handelt es sich um eine Art des Fingerprintings, bei der zahlreiche Amplifikationsprodukte entstehen (bei *Verticillium dahliae* zwischen 7 und 27), deren Länge zwischen 100 - 3000 bp betragen kann (Berg et al. 2005). Durch diese hohe Anzahl von Banden entstehen für jeden Erreger typische Amplifikatmuster, die nach der PCR-Reaktion auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden können. Diese Bandenmuster werden eingescannt und ausgewertet. Auf diese

Weise können z. B. Bakterien- oder Pilzgemeinschaften analysiert und unterschieden werden, die aus der Rhizosphäre extrahiert wurden (Berg et al. 2005). Neben diesen erregertypischen Fingerprints werden häufig auch genetische Unterschiede zwischen Isolaten einer Art sichtbar. Die BOX-PCR ist in der Unterscheidung von Bakterienisolaten inzwischen eine moderne, gebräuchliche Methode, bei Pilzen wurde sie bisher weniger häufig angewandt (Riley et al. 1991, Martin et al. 1992, van Belkum 1993, van Belkum et al. 1994, Tenover et al. 1994, Hermans et al. 1995, Berg et al. 2005).

Im Labor von Frau Prof. Smalla wird die BOX-PCR nach der Beschreibung von Rademaker et al. (1997), mit dem Primer BOXA1R (Sequenz: CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G) (Martin et al. 1992) durchgeführt.

Zur weiteren Differenzierung von *M. anethi*-Isolaten wurde dieser bewährte Primer erprobt. Für den Mastermix wurde ein 25 µl Ansatz gewählt, bestehend aus: 13,25 µl TdW, 2,5 µl 10x Stoffel-Puffer, 2,5 µl 2 mM dNTPs, 3,75 µl 25 mM MgCl₂, 1,25 µl DMSO, 0,5 µl Primer, 0,25 µl DNA-Polymerase (Stoffel-Fragment), sowie 1 µl DNA Zusatz.

Die PCR-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Denaturieren: initiale Reaktion 7 min bei 94 °C, dann 30 Zyklen bei 94 °C für 1 min; Annealing 1 min bei 53 °C; Polymerisation bei 65 °C für 8 min und bei der letzten Reaktion 65 °C für 16 min. 10 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1,5 %iges sehr langes TBE-Agarosegel aufgetragen.

1.6.3 Ergebnisse

1.6.3.1 Anlage einer Isolatesammlung

In der Laufzeit des Projektes konnte eine Sammlung von ca. 100 *M. anethi* Isolaten von Praxisstandorten und den eigenen Versuchspartzellen angelegt werden. Für die Feldversuche wurden von den Projektpartnern 24 Saatgutproben aus unterschiedlichen Quellen zur Verfügung gestellt. Von den Pflanzen, die in Isolierungspartzellen angebaut wurden, konnten zahlreiche neue Isolate in Reinkultur übernommen werden, die die bereits bestehende Isolatesammlung ergänzen (Abb. 108).

Gerade in den Sommermonaten erwies sich die Inkulturnahme als schwierig, da die Verunreinigungsquote mit anderen Pilzen sehr hoch war. Aus diesem Grund musste eine sehr viel höhere Anzahl von Blattabschnitten desinfiziert werden. Anfang November konnten bessere Ergebnisse erzielt werden, da sich der Fremdpilzbesatz deutlich verringert hatte. Die ca. 100 Isolate wurden kultiviert und vermehrt.

1.6.3.2 DNA-Isolierung

Je 5 µl der unverdünnten, gereinigten, genomischen DNA wurden auf ein 1 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Aufgrund der generell sehr geringen Ausbeuten waren, auf dem Gel kaum Banden zu erkennen. Für die weiteren Untersuchungen wurden 16 Proben ausgewählt, die höhere Konzentrationen aufwiesen. Eine exakte DNA-Bestimmung oder Einstellung erfolgte nicht.

1.6.3.3 PCR mit den Primern ITS 1F und ITS 4

Nachdem die Bedingungen zur Isolierung der pilzlichen DNA entwickelt und optimiert worden waren, konnten mit den ITS-Primern 1F und ITS 4 erste molekularbiologische Unterschiede zwischen 16 Isolaten nachgewiesen werden (Abb. 109). Es ergaben sich sowohl einfache als auch Doppelbanden.

Zur weiteren Differenzierung wurden sieben Proben der ersten Reaktion ausgewählt, die deutliche Unterschiede aufwiesen (Isolate 1, 3, 6, 8, 9, 13, 15) und die Amplicons mit Hinfl geschnitten (Abb. 110).



Abb. 108: Kulturwachstum von *M. anethi*: Ausgangsblattbefall auf einer Blattfieder (links oben); erstes Kulturwachstum nach der Desinfektion (rechts oben); Kultur nach zwei Monaten (unten links) und 7 Monaten (rechts unten) Wachstum.

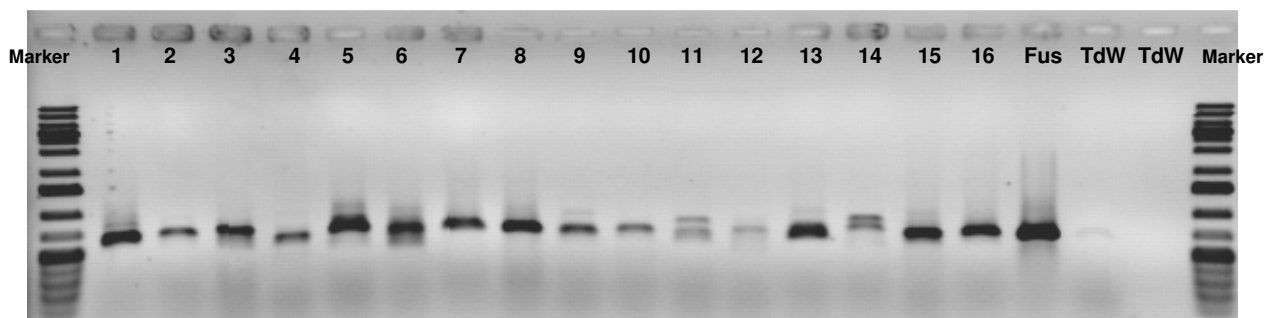


Abb. 109: Ampliconmuster von 16 *M. anethi*-Isolaten und einer *Fusarium*-Kontrolle nach PCR mit ITS-Primern ITS1F und ITS4 (DNA-Marker).

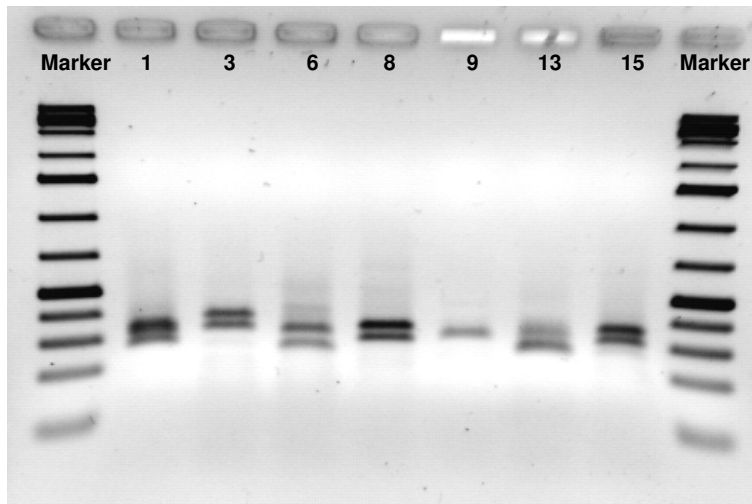


Abb. 110: Elektrophoretische Analyse von Hinf1 geschnittenen PCR-Produkten nach Amplifikation genomischer DNA von sieben ausgewählten *M. anethi*-Isolaten mit der Primerkombination ITS1F und ITS4 (DNA-Marker).

1.6.3.4 PCR mit Primern: NS1 und EF3

Nach Einsatz des Primerpaars NS1/EF3 waren Unterschiede zwischen den amplifizierten Genomfragmenten verschiedener *M. anethi* Isolate zu erkennen (Abb. 111). Nach Restriktion der PCR-Produkte mittels Hinf1 bestätigten sich diese polymorphen Banden zwischen den verschiedenen *M. anethi* Isolaten aber nicht (Abb. 112).

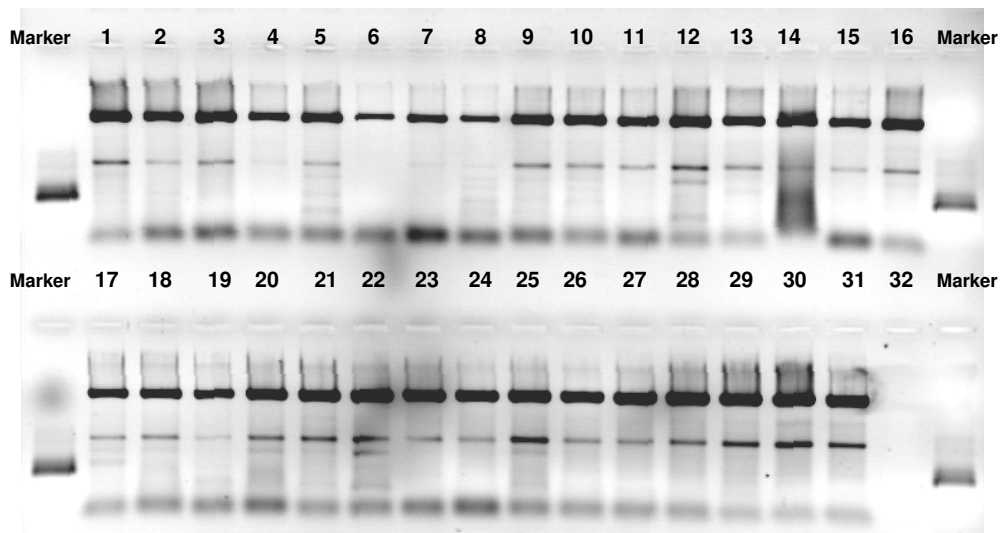


Abb. 111: Amplifikatmuster von genomischer DNA von 32 *M. anethi*-Isolaten nach PCR mit ITS-Primern NS1 und EF3 (der eingesetzte Marker war fehlerhaft).

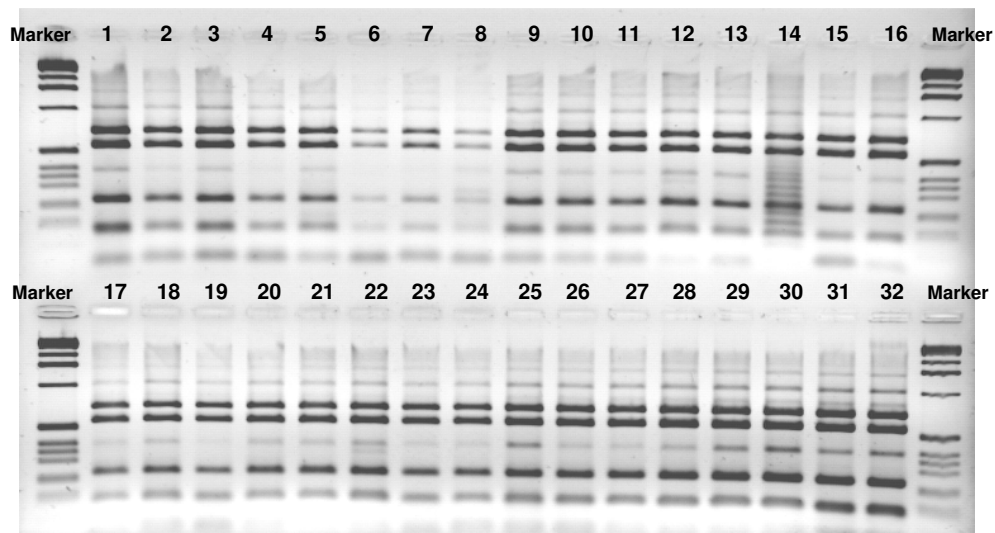


Abb. 112: Amplifikatmuster von genomischer DNA von 32 *M. anethi*-Isolaten nach PCR mit ITS-Primern NS1 und EF3 und einer Restriktion mit Hinf1 (DNA-Marker).

1.6.3.5 Box-PCR

Bei der BOX-PCR wurden zahlreiche unterschiedliche Bandenmuster (Abb. 113) zwischen den Isolaten sichtbar, die auf genomasierte Unterschiede hindeuteten. Die BOX-PCR lieferte damit deutlichere Unterscheidungsmöglichkeiten als die bisher eingesetzten ITS-Primer.

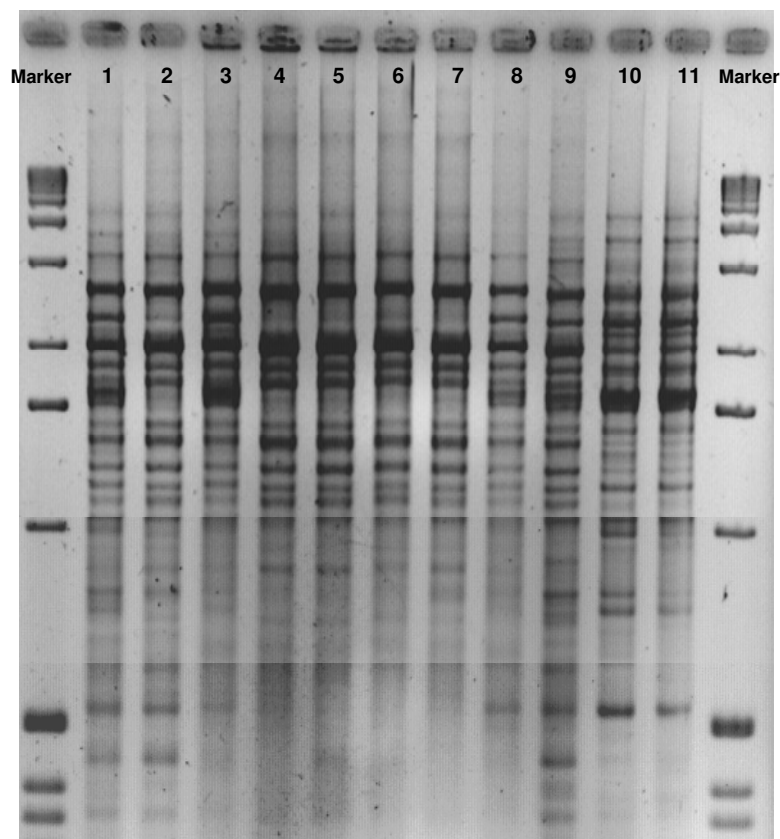


Abb. 113: Amplifikatmuster von genomischer DNA von 11 *M. anethi*-Isolaten mit BOX-PCR Primern (DNA-Marker)..

1.6.4 Ausblick

Die ersten Ergebnisse der molekularbiologischen Differenzierung von *M. anethi*-Isolaten offenbaren genetische Unterschiede. Diese genetische Variabilität muss weiter untersucht werden. Die vorher beschriebenen, sehr aussichtsreichen Arbeiten, könnten mit den bisher vorliegenden Isolaten weitergeführt werden. Neben dem Aspekt der Verbreitung der Krankheit durch infiziertes Saatgut müsste geprüft werden, inwieweit sich einige epidemiologische Fragen mit dieser Isolatesammlung klären lassen. Dazu gehört die Frage, ob sich in den Hauptanbaugebieten besonders aggressive Formen herausgebildet haben, die für die extremen Ertragsausfälle in den letzten Jahren verantwortlich sind.

1.6.5 Zitierte Literatur

BERG, G., ZACHOW, C., LOTTMANN, J., GÖTZ, M., COSTA, R. und SMALLA, K. (2005): Impact of Plant Species and Site on Rhizosphere-Associated Fungi Antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. Appl Environ Microbiol. 71, 8, 4203 - 4213

HERMANS PW, SLUIJTER M, HOOGENBOEZEM T, HEERSMA H, van BELKUM A, de GROOT R. (1995): Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. J Clin Microbiol. 33, 6, 1606 - 1612

MARTIN, B., HUMBERT, O., CAMARA, M., GUENZI, E., WALKER, J., MITCHELL, T., ANDREW, P., PRUDHOMME, M. et al. (1992): A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Research 20, 3479 - 3483.

PETZOLDT, S. (1989): Zur Biologie und Schadwirkung des Erregers der Blatt- und Stengelanthraknose (*Mycosphaerella anethi* Petr.) am Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) - 1. Mitteilung. Drogenreport 3, 49 - 65

PETZOLDT, S. (1990): *Mycosphaerella anethi* - Ein Beitrag zur Entwicklungsgeschichte. Boletus 14, 49 - 56

RILEY DE, SAMADPOUR M, KRIEGER JN. (1991): Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. J Clin Microbiol. 29, 12, 2746 - 2751

TENOVER, F.C., ARBEI, T. R., ARCHER, G., BIDDLE, J., BYRNE, S., GOERING, R., HANCOCK, G., HÉBERT, G.A., HILL, B., HOLLIS, R. (1994): Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 32, 2, 407 - 415

van BELKUM A, BAX R, PEERBOOMS P, GOESSENS WH, van LEEUWEN N, QUINT WG. (1993): Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 31, 4, 798 - 803

van BELKUM A, BAX R, PREVOST G. (1994): Comparison of four genotyping assays for epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13, 5, 420 - 424

2. Verwertung

Die Ergebnisse der wissenschaftlichen Untersuchungen wurden den Projektbeteiligten jährlich in einem Vortrag vorgestellt und diskutiert. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt in Fachvorträgen und Postern auf Tagungen und Fachveranstaltungen. Es sind Veröffentlichungen in einschlägigen Fachzeitschriften in Vorbereitung.

Der entwickelte PTA-ELISA soll als quantitative Variante den Praxispartnern, dem amtlichen Pflanzenschutzdienst sowie weiteren Interessenten übergeben werden. Hierfür wird auf Wunsch eine Demonstrationsveranstaltung bzw. die individuelle Einarbeitung organisiert werden. Die erforderlichen Immunreagenzien sowie die Pilzkulturen zur Vorbereitung der Konzentrationsstandards werden vom JKI-EP zur Verfügung gestellt.

Neben ihrer unmittelbaren Praxisrelevanz schaffen die vorgestellten Ergebnisse die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit zur weiteren Erforschung dieser Fenchelkrankheit mit dem Ziel der dauerhaften Gesunderhaltung der Bestände und des Erntegutes, als Voraussetzung zur Sicherung einer wirtschaftlich und ökologisch nachhaltigen Produktion dieser wertvollen Arzneipflanze in Deutschland.

Im Zentrum des inzwischen angelaufenen Anschlussprojektes werden in den nächsten 3 Jahren die PCR-gestützte Quantifizierung des Pilzbefalls und weitere Aufklärung dieses immer noch wenig verstandenen Pathosystems stehen. Durch den Einsatz und die Optimierung der qPCR wird es erstmals möglich sein, die wichtigsten Einflussfaktoren auf die Krankheitsentwicklung zu identifizieren und in ihrer Bedeutung zu werten.

Einfluss von pflanzenbaulichen Maßnahmen auf den Fruchtbefall mit *M. anethi*

- Untersuchung der Wirksamkeit von
 - Fungiziden
 - Beizmitteln
 - Pflanzenstärkungsmitteln
 - alternativen Behandlungen
- Bedeutung von
 - Feldgröße
 - Pflanzenabstand
 - Zwischensaaten
 - weiteren pflanzenbaulichen Maßnahmen

Epidemiologische Analysen

- Bedeutung des Verseuchungsgrades des Saatguts für die Krankheitsentwicklung
 - Dynamik der zeitlichen und räumlichen Ausbreitung des Pilzes im gesunden Bestand, ausgehend von einer einzelnen Infektionsquelle
 - Beziehung zwischen Saatgutbefallsrate und Befallsniveau des Erntegutes
- Feldabstände zur Minimierung des Konidieneintrages aus anderen Feldern
- mögliche Bodenübertragbarkeit des Erregers

3. Veröffentlichungen

3.1 Vorträge

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Arbeitsfortschritte: Entwicklung einer Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten und Jungpflanzen. JKI Wissenschaftlerseminar Quedlinburg, 22.09.09 Vortrag

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Ermittlung der Direktwirkung von Fungiziden auf *Mycosphaerella anethi* im Agarplattenversuch. Anwenderseminar zum Pflanzenschutz in Arznei- und Gewürzpflanzen 03.02.2010 Bernburg, Vortrag

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Projektskizze: „Entwicklung einer Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten und Jungpflanzen - Erster Zwischenbericht“. Sitzung der FAH Arbeitsgruppe „Arzneipflanzenanbau“ der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH) am 22.02.10 in Bernburg, Vortrag

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Projektskizze: „Entwicklung einer Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten und Jungpflanzen - Zweiter Zwischenbericht“. Sitzung der FAH Arbeitsgruppe „Arzneipflanzenanbau“ der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH) am 21.02.11 in Bernburg, Vortrag

3.2 Poster

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Entwicklung einer PCR-Methode zum Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelsaatgut. 18. Bernburger Winterseminar. 17. - 18.02.2009, Bernburg, Poster

TAUBENRAUCH, K., HAU, B., KÜHNE, T.: *Mycosphaerella anethi* – ein samenübertragbarer Schaderreger an Fenchel. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06. - 09.09 2010 Humboldt-Universität zu Berlin, Poster

TAUBENRAUCH, K., HAU, B., KÜHNE, T.: Ermittlung des Befallsniveaus von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06. - 09.09 2010 Humboldt-Universität zu Berlin, Poster

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. Tagung 25. - 26.10.2010 in Neustadt an der Weinstraße. Poster

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Erste Ergebnisse zur quantitativen Ermittlung des *Mycosphaerella anethi* - Befalls an Fenchelfrüchten. Tagung Arzneipflanzenanbau in Deutschland - mit koordinierter Forschung zum Erfolg. Tagung 25. - 26.10.2010 in Neustadt an der Weinstraße, Poster

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Totalverlust von Fenchelernte durch *Mycosphaerella anethi* - Befall. 21. Bernburger Winterseminar. 22.- 23.02.2011, Bernburg, Poster

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Bewertung von Arzneifenchelchargen bezüglich des quantitativen Befalls von *Mycosphaerella anethi* . 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, Deutscher Fachausschuss für Arznei-, Gewürz- und Aromapflanzen, Humboldt Universität zu Berlin 19. - 22.09.2011, Poster

3.3 Veröffentlichungen

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Entwicklung einer PCR - Methode zum Nachweis von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelsaatgut. 18. Bernburger Winterseminar. 17. - 18.02.2009, Bernburg, Tagungsband Kurzfassung der Referate und Poster S. 44

TAUBENRAUCH, K., HAU, B., KÜHNE, T.: *Mycosphaerella anethi* – ein samenübertragbarer Schaderreger an Fenchel. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06. - 09.09 2010 Humboldt-Universität zu Berlin, Julius Kühn-Archiv, S. 401, 428, 2010

TAUBENRAUCH, K., HAU, B., KÜHNE, T.: Ermittlung des Befallsniveaus von *Mycosphaerella anethi* an Fenchelfrüchten. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, 06. - 09.09 2010 Humboldt-Universität zu Berlin, Julius Kühn-Archiv, S. 402, 428, 2010

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

TAUBENRAUCH, K., KÜHNE, T.: Bewertung von Arzneifenchelchargen bezüglich des quantitativen Befalls von *Mycosphaerella anethi* . 6. Fachtagung Arznei- und Gewürzpflanzen, Deutscher Fachausschuss für Arznei-, Gewürz- und Aromapflanzen, Humboldt Universität zu Berlin 19. - 22.09.2011, Tagungsband