

Gerstenflugbrand: Molekulare Nachweismethode für Saatgut

Anouk Guyer¹, Eveline Jenny¹, Thomas Hebeisen², Irene Bänziger¹, Andreas Kägi¹, Susanne Vogelgsang¹, Franco Widmer¹ und Laure Weisskopf^{1,3,4}

¹Agroscope, Institut für Nachhaltigkeitswissenschaften INH, 8046 Zürich, Schweiz

²Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, 8046 Zürich, Schweiz

³Agroscope, Institut für Pflanzenbauwissenschaften IPB, 1260 Nyon, Schweiz

⁴CHANGINS, Fachhochschule für Weinbau und Önologie, 1260 Nyon, Schweiz

Auskünfte: Laure Weisskopf, E-Mail: laure.weisskopf@agroscope.admin.ch



Gerstenflugbrand: Befallene Pflanzen stellen ein grosses Verbreitungspotenzial dar. (Foto: Gabriela Brändle, Agroscope)

Gerstenflugbrand ist im Saatgut schwer nachzuweisen, und die klassische, mikroskopische Diagnose ist äusserst zeitaufwändig. Mit einer molekularen Methode ist es nun möglich, Gerstenflugbrand im Saatgut mit geringem Zeitaufwand und hoher Sensitivität nachzuweisen, wodurch Massnahmen gegen eine weitere Ausbreitung ergriffen werden können.

Der Flugbrand in Getreide (*Ustilago* spp.) gehört zu den samenbürtigen Krankheiten, deren Kontrolle im biologischen Landbau eine zunehmende Herausforderung darstellt. Unter günstigen Infektionsbedingungen bilden befallene Pflanzen Brandähren, die durch die Freisetzung von Sporen umliegende Pflanzen während der Blüte infizieren. Der Erreger des Gerstenflugbrands (*Ustilago nuda*) überdauert im Embryo des Samens als Ruhemyzel, dessen Wachstum durch die Samenkeimung aktiviert wird.

Nach dem Eindringen in den Vegetationspunkt der wachsenden Getreidepflanze, wird der Krankheitserreger passiv zur Blüte transportiert (Wunderle 2013). Die befallene Pflanze wird dadurch zur Quelle von neuem Sporenmaterial, die ein grosses Verbreitungspotenzial der Krankheit darstellt.

Im konventionellen Anbau wird Flugbrand mittels einer systemisch wirkenden, chemisch-synthetischen Saatgutbeizung effizient kontrolliert. Die Richtlinien des biologischen Landbaus verbieten hingegen den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln und da zurzeit noch keine wirksamen biokompatiblen Beizverfahren zur Verfügung stehen, ist die Aussaat von befallsfreiem Saatgut von grosser Bedeutung. In der Schweiz wird Flugbrandbefall im Saatgut durch Feldbesichtigung von Vermehrungsposten optisch beurteilt. Werden mehr als drei, respektive fünf Brandähren pro Are ausgezählt (Stufe Z₁ bzw. Z₂), dürfen die Posten nicht mehr als Saatgetreide, sondern nur noch als Futter- oder Brotgetreide verwertet werden (Krebs *et al.* 2014). Alternativ zum Feldnachweis kann die Krankheit mittels mikroskopischer Untersuchung des Saatguts nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis besteht eine von der ISTA (International Seed Testing Association) anerkannte Methode, in der 2000 Embryonen aus Getreidekörnern herausgelöst werden und nach dem Anfärben des Pilzmyzels die Anzahl befallener Körner visuell bestimmt wird. Diese Methode wird zum Beispiel an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) angewendet, mit einer Schadgrenze von 1%. In der Schweiz wird diese aufwändige Flugbranduntersuchung auf Saatgut nicht durchgeführt.

Das Ziel dieses Projekts, das durch den Schweizer Saatgutproduzentenverband SWISSEM unterstützt wurde, war abzuklären, ob die Untersuchung von Saatgut mit herkömmlichen Methoden durch eine spezifische molekulare Detektionsmethode abgelöst werden kann. Mit einem molekularen Nachweis von *U. nuda* im Saatgut sollte es möglich sein, frühzeitig zu entscheiden,

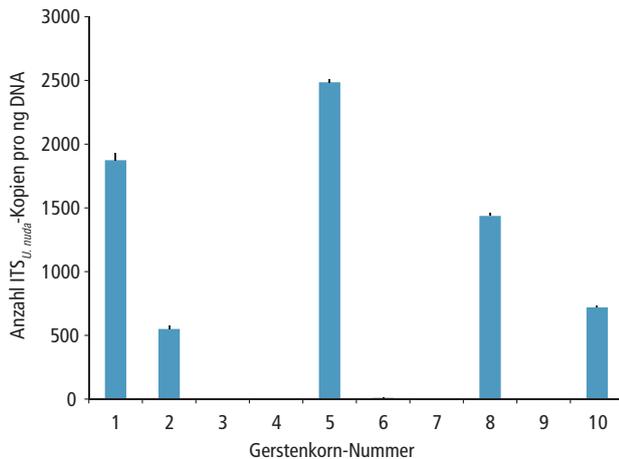


Abb. 1 | Quantitativer Nachweis von *U. nuda* in DNA-Extrakten von zehn Gerstenkörnern eines stark befallenen (21 %) Saatgutpostens der Sorte Sandra. Pro DNA-Extraktion wurden drei technische Wiederholungen auf die Menge vorkommender Pilz-DNA untersucht. Die Menge Pilz-DNA wird als Anzahl Genkopien pro Nanogramm extrahierter DNA zu Beginn der qPCR-Reaktion ausgedrückt (ITS_{U.nuda}: Internal Transcribed Spacer von *Ustilago nuda*). Die Mittelwerte ($n = 3$) und Standardabweichungen der Wiederholungen sind abgebildet.

ob ein Saatgutposten ohne Bedenken ausgesät werden darf. Dieser molekulare Nachweis sollte auf der Extraktion des gesamten Erbguts von Körnern einer Stichprobe aus einem repräsentativen Einsendemuster basieren. Mittels spezifischer Detektion der *U.-nuda*-DNA könnte dann das Vorhandensein des Pilzes nachgewiesen werden. Die Berechnung der ursprünglichen Menge der extrahierten Pilz-DNA sollte eine Aussage zur Stärke des Befalls erlauben. Die Herausforderungen bestanden darin, eine für Pflanzenmaterial entwickelte Methode (Wunderle *et al.* 2012) für die Anwendung auf Mehlextrakte anzupassen, die methodische Nachweisgrenze des Pilzbefalls zu bestimmen und schliesslich die Nachweismethode mit Saatgutposten der Nachbaukontrolle zu verifizieren.

Anpassung der PCR-Reaktion ans Kornmaterial

Für die Anpassung der molekularen Detektionsmethode wurde die DNA aus dem Mehl von einzelnen Gerstenkörnern eines stark mit Flugbrand befallenen Saatgutpostens der Sorte Sandra (21 % Befall im Feld, Krebs *et al.* 2014) extrahiert (NucleoSpin® Plant II DNA Extraction Kit). Zuvor wurden die Körner mit Chloramin T (3 %) behandelt, um zu vermeiden, dass, am Korn haftende Flugbrandsporen detektiert werden, die ein positives Signal geben, aber zu keinem Befall auf dem Feld führen

würden. Die Methode wurde zuerst mittels Standard-PCR optimiert, um die Entstehung von unspezifischen PCR-Nebenprodukten zu reduzieren und dadurch die Spezifität und Sensitivität des nachfolgenden quantitativen Flugbrandnachweises zu erhöhen. Der Nachweis mittels quantitativer PCR (qPCR) bei Einzelkörnern zeigte, dass eine unterschiedliche Menge an Pilzmaterial detektiert wurde (Abb. 1). Vermutlich bildet sich unterschiedlich viel Pilzmyzel im Samenkorn, was zu grossen Unterschieden extrahierter Pilz-DNA führt und eine quantitative Aussage zur Anzahl befallener Gerstenkörner erschwert.

Stichprobengrösse und Nachweisgrenze

Als erster Schritt zur Quantifizierung des Pilzbefalls wurden die Körner zu feinem Mehl verarbeitet, anschliessend durch Sieben homogenisiert und von den Spelzen getrennt. Entscheidende Faktoren für die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des molekularen Nachweises sind die Grösse der Körnerprobe, die Grösse der Mehlstichprobe und die Menge DNA, die für die qPCR eingesetzt wird. Verschiedene Methoden Anpassungen zeigten, dass 1000 Körner Gerste und 200 mg Mehl als Stichprobe für die DNA-Extraktion reproduzierbare Daten erzielten. Die technische Nachweisgrenze, das heisst die Anzahl Genkopien, die in der qPCR-Reaktion detektiert werden können, lag zwischen 10 und 20. Um die Befallsschwelle von einer Kopie Pilz-DNA / ng DNA zuverlässig zu quantifizieren, wird empfohlen, mit 30 ng DNA als Startmaterial zu arbeiten.

Detektion des Befalls mittels Befallsgradienten

Durch das Mischen einer Mehlproube mit, respektive ohne Flugbrandbefall wurde künstlich ein Befallsgradient erstellt, womit die Nachweisgrenze bestimmt werden konnte. Mehlprouben mit einem Befall unterhalb 2‰ waren nicht mehr quantitativ messbar, da keine Verringerung in der Signalthöhe zwischen der Probe mit 1‰ und der Probe mit 0,5‰ Befall beobachtet wurde (Abb. 2a). Die Auswertung der DNA-Schmelztemperaturen (bei der sich die zwei Stränge der DNA-Doppelhelix voneinander lösen) erlaubte es jedoch, die Krankheit bis zu einer Befallsrate von 0,5‰ zuverlässig zu detektieren (Abb. 2b). Die für *U. nuda* spezifische Schmelztemperatur (83 °C) war eindeutig von der negativen Kontrolle (81,5 °C) zu unterscheiden. Gemäss der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft LfL führt ein Befall von über 1‰ mit der ISTA-Methode zum Ausschluss des Saatgutpostens. Mit der auf Mehl angepassten molekularen Diagnose konnte der Flugbrand mit noch höherer Sensitivität (0,5 ‰, entspricht einem befallenen Korn unter gesamthaft 2000 Körnern) detektiert werden. >

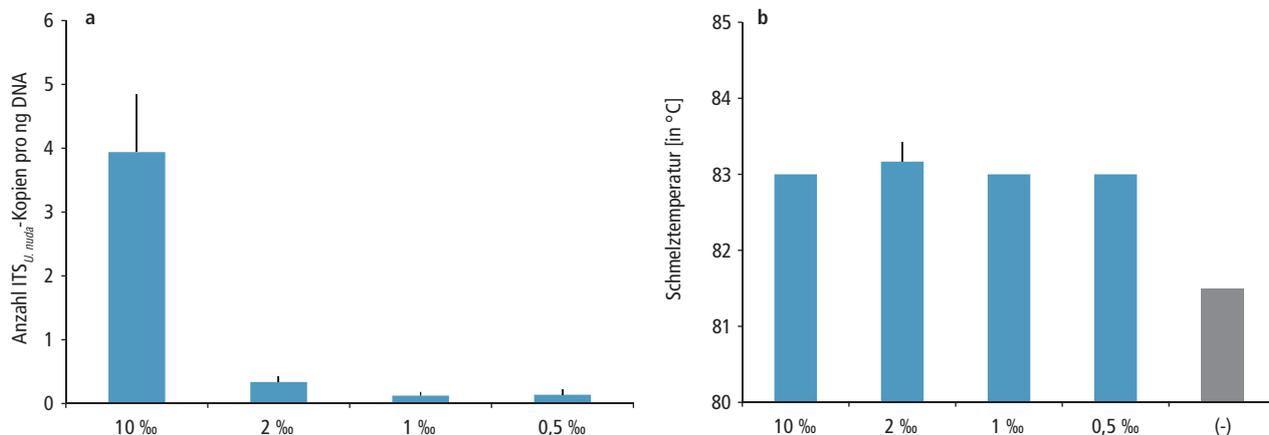


Abb. 2 | Quantitativer Nachweis des Flugbrandbefalls in Mehlproben, deren Gehalt an Flugbrand-infiziertem Material künstlich konstruiert wurde, 10 ‰, 2 ‰, 1 ‰ und 0,5 ‰ (2a) sowie Resultate der Schmelzkurvenanalyse derselben Mehlproben (2b). (-): Negativkontrolle mit Wasser. Die Menge Pilz-DNA wird als Anzahl Genkopien pro Nanogramm extrahierter DNA zu Beginn der qPCR-Reaktion ausgedrückt (ITS_{U. nuda}: Internal Transcribed Spacer von *Ustilago nuda*). Die Mittelwerte (n = 2–3) und Standardabweichungen der technischen Wiederholungen sind abgebildet.

Quantifizierung in Saatgutposten aus der Praxis

Die angepasste molekulare Nachweismethode von *U. nuda* für Gerstensaatzgut wurde durch die Untersuchung von Saatgutposten der Zertifizierungsstelle verifiziert. Bei sämtlichen Proben, die bei der Feldbesichtigung Flugbrandbefall zeigten, konnte der Pilz im Mehl nachgewiesen werden (Abb. 3a und 3b, Proben A, I, J). Sämtliche Proben, die mittels qPCR als befallsfrei eingestuft wurden, zeigten auch auf dem Feld keinen Befall (Abb. 3a und 3b, Proben B–H).

Schlussfolgerungen

- Gerstenflugbrand kann bis zu einer Befallsrate von 0,5 ‰ im Saatgut zuverlässig detektiert werden.
- Bei Saatgutposten ohne im Feld beobachteten Flugbrandbefall wird mit der entwickelten Methode kein Flugbrand detektiert.
- Die molekulare Diagnose ist nicht nur sensitiver als die mikroskopische, sie ist auch weniger zeitaufwändig, insbesondere, wenn viele Posten parallel aufbereitet und analysiert werden müssen.

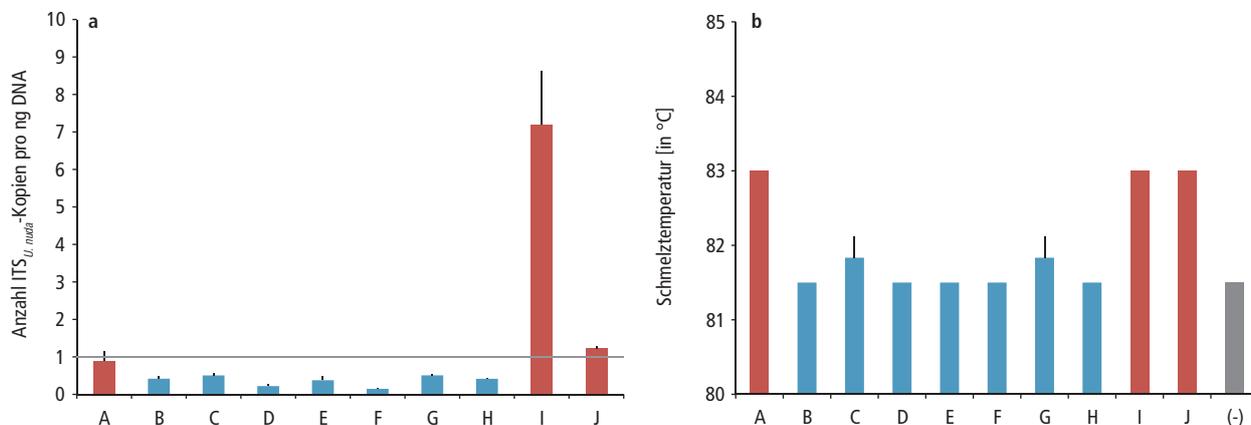


Abb. 3 | Quantitativer Nachweis des Flugbrandbefalls in Mehlproben der Zertifizierungsstelle (3a) und Resultate der Schmelzkurvenanalyse derselben Mehlproben (3b). A, I, J: Proben mit Flugbrand; B–H: Proben ohne Flugbrand; (-): Negativkontrolle mit Wasser. Die horizontale Linie in Abb. 3a repräsentiert die Befallsschwelle von 1 Genkopie/ng DNA. Die Mittelwerte (n = 3) und Standardabweichungen der Wiederholungen sind abgebildet.

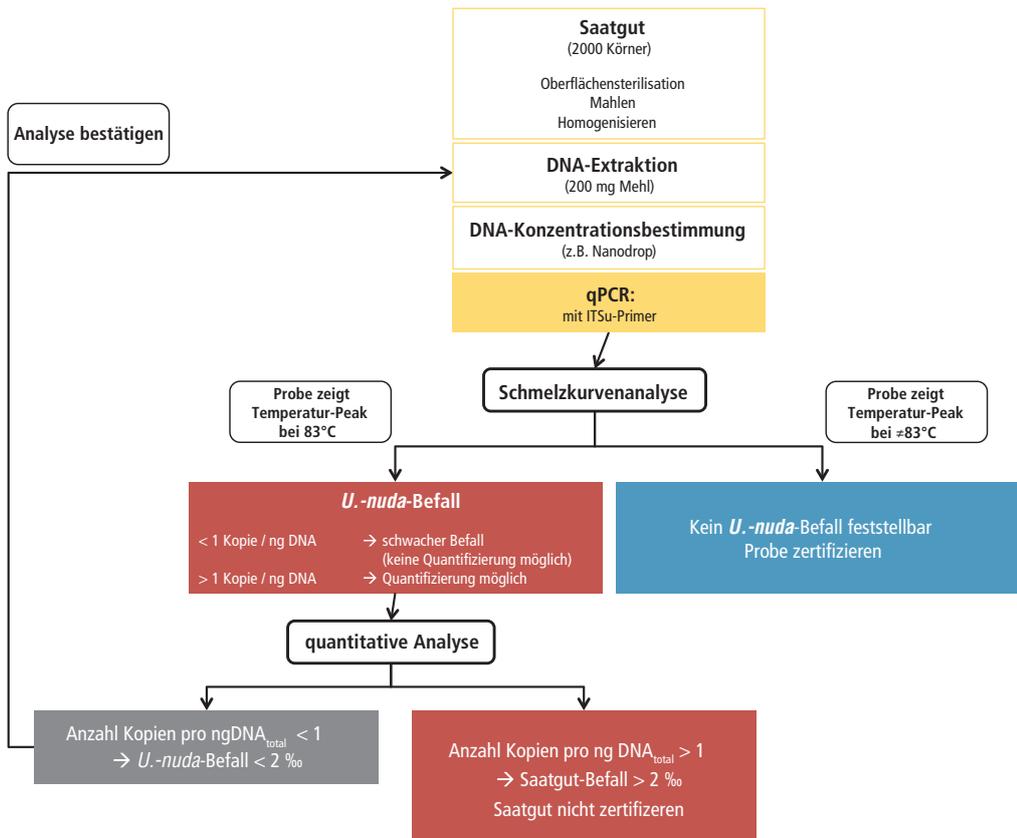


Abb. 4 | Arbeitsprozess des quantitativen molekularen Nachweises von *U. nuda* in Gerstensaatgut.

Ausblick

- Die molekulare Diagnose von Flugbrand im Saatgut könnte in Zukunft dazu führen, dass nur noch befallsfreies Saatgut für Vermehrungszwecke ausgesät wird (Abb. 4). Befallsfreie Ausgangsposten würden langfristig zu einer Eindämmung der Krankheit führen und die BioSaatgutproduktion ohne Risiko der Krankheitsausbreitung ermöglichen.
- Zusätzlich zum Nachweis der Krankheit in inländischen Vermehrungsposten könnte mit diesem Test auch Import-Gebrauchssaatgut kontrolliert werden.
- Anhand von Saatgutposten mit unterschiedlich hohem Befall aus der Ernte 2015 wird die Reproduzierbarkeit und Praktikabilität dieser Nachweismethode weiter untersucht, um zu entscheiden, ob diese Methode in Zukunft bei der Zertifizierung von Bio-Gerstensaatgut routinemässig angewandt werden könnte.
- Auch für weitere Flugbranderreger (z. B. Weizenflugbrand) könnte dieser molekulare Nachweis angepasst werden – ein weiteres Ziel in der Bekämpfung dieser für den biologischen Landbau relevanten Krankheiten. ■

Dank

Die Autoren bedanken sich beim Schweizer Saatgutproduzentenverband SWISSEM für die finanzielle Unterstützung. Besonderer Dank geht auch an Heinz Krebs, der die Versuche zur Regulierung des Gerstenflugbrands bei Agroscope initiiert hat, und der durch seine Expertise und die Bereitstellung von hochbefallenem Saatgutmaterial massgebend zum Erfolg des Projekts beigetragen hat.

Literatur

- Krebs H., Kägi A., Bänziger I., Herzog C., Hebeisen T., Vogelsgang S. & Weisskopf L., 2014. Gerstenflugbrand: Sortenanfälligkeit und Bekämpfungsalternativen. *Agrarforschung* 5 (09), 374–377.
- Wunderle J., Leclerque A., Schaffrath U., Slusarenko A. & Koch E., 2012. Assessment of the loose smut fungi (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in tissues of barley and wheat by fluorescence microscopy and real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 133, 865–875.
- Wunderle J., 2013. Entwicklung und Anwendung von Methoden für einen frühen Nachweis der Flugbranderreger *Ustilago nuda* und *U. tritici* in Gerste und Weizen. Dissertation. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen. Zugang: <http://publications.rwth-aachen.de/record/211237/files/4506.pdf> [16.9.2015], 124 S.