MITTEILUNGEN

PCR-Nachweis von Zoosporen des Kartoffelkrebs-Erregers *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. zur Bewertung der Reaktion von Kartoffelsorten

PCR-detection of zoospores from Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc., the causal agent of potato wart for evaluating the reaction of potato varieties

Einleitung

Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc. ist der Erreger des Kartoffelkrebses und kommt europaweit vor. Da er ein obligat biotropher Pilz ist, infiziert er nur lebendes, sich teilendes Gewebe wie z. B. die Keimspitzen von Kartoffelknollen. Der Pilz produziert Zoosporen, die im feuchten Milieu meristematisches Gewebe befallen. Als Ergebnis einer erfolgreichen Infektion werden die charakteristischen blumenkohlartigen Wucherungen produziert (Abb. 1).

In den Wucherungen bilden sich sowohl die kurzlebigen Sommersori als auch Überdauerungsorgane, die so genannten Winter- oder Dauersori. Die Dauersori besitzen eine feste chitinhaltige Zellwand, die für eine lange Überdauerungszeit im Boden bestimmt ist. So bleibt die Infektiosität dieser Dauersori über viele Jahre hinweg erhalten. Daher ist der Kartoffelkrebs als Quarantänekrankheit gelistet (OEPP/EPPO, 1999). Um die Gefahr einer Ausbreitung dieses Quarantänepilzes einzudämmen, sollten in Befallsregionen auf nicht verseuchten Flächen bevorzugt krebsresistente Kartoffelsorten gepflanzt werden. Deshalb werden in Amtshilfe für das Bundessortenamt jährlich Kartoffelneuzüchtungen von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft auf Resistenz gegenüber den verschiedenen Pathotypen des Kartoffelkrebserregers untersucht.

Zur Beurteilung von Anfälligkeits- und Abwehrreaktionen bei Kartoffeln gegen den Kartoffelkrebs lassen sich eindeutige Resistenz- (nekrotisiertes Gewebe, Abb. 3 und 4) und Anfälligkeitsreaktionen (blumenkohlartige Wucherungen mit Sommer- und Dauersori oder nur Sommersori am Keim) problemlos ansprechen. Schwieriger sind die so genannten „Grenzfälle" zu beurteilen, bei denen zwischen „moderat anfällig" (z. B. Abb. 2) und „schwach resistent" zu unterscheiden ist (LANGERFELD und STACHEWICZ, 1994).

Wir berichten hier über den Einsatz der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion, Polymerase Chain Reaction) auf Basis von ITS (Internal Transcribed Spacers) Primer zur Unterstützung der Beurteilung eben dieser Grenzfälle. Mit den hergestellten krebsspezifischen Primern lassen sich im so genannten „Bottleneck-Verfahren" freigesetzte Zoosporen nachweisen. Der Vorteil bei Verwendung von Zoosporen ist der Umstand, dass an infizierten Pflanzenorganen nur von lebenden Sommersori Zoosporen ausgeschieden werden können. Somit unterstützt die PCR über den Nachweis von Zoosporen die Bewertung so genannter Grenzsorten. Bei der Bewertung „schwach resistent" oder „schwach anfällig" ist aber zu berücksichtigen, dass bis zu 5 lebende Sommersori je Keim für die Beurteilung „schwach resistent" toleriert werden, wenn gleichzeitig am selben Keim Abwehrnekrosen vorhanden sind.

Ergebnisse und Diskussion

Die ITS-DNA-Region (ribosomale DNA, BUNTING et al., 1996) von *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. wurde verwendet, um spezifische Primer für eine PCR zu entwickeln. Dazu wurde DNA aus Wucherungen aller vier Krebspathotypen (1, 2, 6, 18) extrahiert, die zurzeit in Deutschland zur offiziellen Krebsprüfung bei Kartoffeln verwendet werden. In Kombination mit dem Universal-Primer ITS 4 und dem spezifischen Primer Kbr 1 wurde von allen vier Krebspathotypen ein gleich großes Fragment von 543 bp mit der PCR amplifiziert (Abb. 5).

Zur Gewinnung von Zoosporen wurden die Keime von schwach resistenten bzw. schwach anfälligen Kartoffelsorten für 4 h in Aqua dest. bei 10–16 °C aufbewahrt, anschließend abpipettiert und sofort in 96 % Alkohol bis zu einer Endkonzentration von 70 % präzipitiert.

Mit dieser Maßnahme konnte nach dem Ausfällen der Zoosporen in Äthanol und einer anschließenden DNA-Extraktion (CTAB-Methode, DAY and SHATTOCK, 1997) amplifizierbare Zoosporen-DNA von Sommersori erhalten werden.

Die in Äthanol präzipitierten Zoosporen eigneten sich zur Unterstützung der Differenzierung von „schwach resistenten" und „moderat anfälligen" Reaktionen bei Kartoffelsorten nach der Inokulation mit Kartoffelkrebs, da sich nur die von Sommersori freigesetzten Zoosporen bei den moderat anfällig reagierenden Kartoffelsorten mit der PCR und den spezifischen Primern nachweisen ließen. Kein PCR-Signal war von schwach resistent oder resistent reagierenden Kartoffelsorten sichtbar, da hier die Zoosporen durch die Resistenzreaktion der Kartoffel abgetötet worden waren. In Abbildung 6 sind die Übergänge zwischen „moderat anfällig" (Bahn 5) und „schwach resistent" (Bahn 7) dokumentiert.

Eine Unterscheidung der z. Zt. In Deutschland wichtigen Krebspathotypen soll in Zukunft auch mit der PCR ermöglicht werden. Dadurch würde die arbeitsaufwendige Differenzierung der Pathotypen bei Auftreten neuer Krebsherde mittels eines Differentialsortimentes erleichtert werden können.

Eine ausführliche Beschreibung der Versuche erscheint demnächst in der Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz mit dem Titel: „PCR – detection of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. and its zoospores".

Literatur

BUNTING, T. E., K. A. PLUMLEY, B. B. CLARKE, B. I. HILLMAN, 1996: Identification of Magnaporthe poae by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions. Phytopathology **86,** 398–404.

DAY, J. P., R. C. SHATTOCK, 1997: Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. European J. of Plant Path. **103,** 379–391.

LANGERFELD, E., H. STACHEWICZ, 1994: Assessment of varietal reactions to potato wart (Synchytrium endobioticum) in Germany. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **24,** 793–798.

OEPP/EPPO, 1999: *Synchytrium endobioticum*: soil tests and descheduling of previously infested plots. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **29,** 225–231.

F. NIEPOLD (Braunschweig) und H. STACHEWICZ (Kleinmachnow)

Abb. 1. Hoch anfällige Kartoffelsorte gegen *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. mit der typischen blumenkohlartigen Wucherung.

Abb. 2. Moderat anfällige Kartoffelsorte mit vereinzelt kleinen Wucherungen. Mit der PCR konnten hier Zoosporen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 6).

Abb. 3. Resistente Kartoffelsorte mit den typischen Abwehrreaktionen des Keimes. Mit der PCR wurden bei diesem Keim keine Zoosporen nachgewiesen (vgl. Abb. 6).

Abb. 4. Frühe Abwehrreaktion einer krebsresistenten Kartoffelsorte. Auch hier konnten keine Zoosporen mit der PCR nachgewiesen werden.

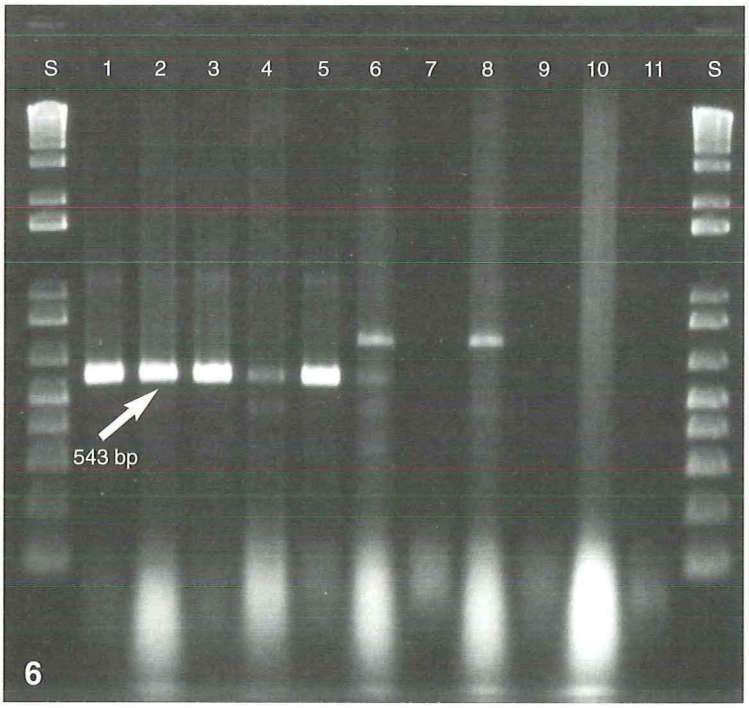

Abb. 6. PCR-Unterscheidung von „moderat anfälligen" und „schwach resistenten" Keimen nach künstlicher Inokulation mit *Synchytrium endobioticum*. Nur bei der moderat anfälligen Reaktion einer Kartoffelsorte wurden Zoosporen entlassen, die mit dem Primerpaar Kbr1 und ITS4 nachweisbar waren (Bahn 5). Kein PCR-Signal war sichtbar von der schwach resistent oder hoch resistent reagierenden Kartoffelsorte (Bahn 7 und 9), da durch die Resistenzreaktion der Kartoffel die Zoosporen abgetötet wurden und somit auch nicht schwärmen konnten. Als Kontrolle wurde die Wucherung einer hoch anfälligen Kartoffelsorte zum Schwärmen der Zoosporen verwendet (Bahnen 1 und 3). Bahnen 2, 4, 6, 8 und 10 repräsentieren die nach der 4-stündigen Wasserbehandlung extrahierten Kartoffelkeime. In einem Kartoffelkeim (Bahn 6) befinden sich noch intakte Sommersori. Deshalb ist hier auch eine schwache 543 bp-DNA-Bande sichtbar. Bahn S repräsentiert den DNA-Längenstandard und Bahn 11 ist die Negativkontrolle (Wasser). Ein 750 bp großes DNA-Fragment erscheint nur bei der Keimaufarbeitung und ist unspezifisch.

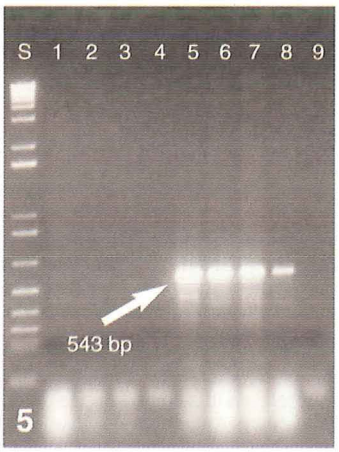

Abb. 5. Überprüfung der Spezifität der Primerkombination Kbr1 und ITS 4 an den hauptsächlich in Deutschland vorkommenden vier Krebsrassen 1, 2, 6 und 18 (Bahnen 5 bis 8). Die Bahnen 1 bis 3 repräsentieren die nahe verwandten Pilze *Olpidium brassicae* (1), *Spongospora subterranea* (2) und den Oomyceten *Phytophthora infestans* (3). Bahn 4 entspricht der Negativ-Kontrolle Erstling-DNA ohne Wucherungen. S ist der Längenstandard und K die Wasserkontrolle. Die Größe des amplifizierten Fragmentes beträgt 543 bp.