

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

Nachweis von *Phytophthora infestans* in Stengeln von Kartoffelpflanzen mittels einer Kanülen-Anstechmethode und der „nested PCR“

Detection of *Phytophthora infestans* in stems of potato plants by using a syringe pricking method in combination with a “nested PCR”

Von Frank Niepold und Bärbel Schöber-Butin

Zusammenfassung

Mit einer neuen Kanülen-Ausstanzmethode konnte *Phytophthora infestans* aus Kartoffelstengeln in Kombination mit der alkalischen Extraktionsmethode und der „nested PCR“ nachgewiesen werden. Die neu entwickelten Primer zeigten ein 276 bp großes DNA-Fragment, wenn *Phytophthora infestans* im Gewebe bis zu einer Menge von ca. 5 ng Myzel vorlag. Ein parallel durchgeführter Biotest an Kartoffelscheiben erwies sich als nicht so sensitiv.

Stichwörter: *Phytophthora infestans*, Kartoffelstengel, Kanülen-Ausstanzmethode, „nested PCR“

Abstract

With a new syringe punching sampling procedure *Phytophthora infestans* was detectable in potato stems by using the alkaline extraction procedure and the “nested PCR”. The newly developed primers showed a 276 bp DNA fragment when *Phytophthora infestans* was present in the tissue at a concentration of 5 ng mycelia. A parallel performed bioassay on potato tuber slices was not very efficient.

Key words: *Phytophthora infestans*, potato stems, syringe punching procedure, “nested PCR”

Einleitung

Eine der wichtigsten Pilzkrankheiten der Kartoffel ist die Kraut- und Knollenfäule, die durch *Phytophthora infestans* verursacht wird. Der Pilz kann bei günstigen Witterungsbedingungen die Kartoffelpflanze, die nicht mit geeigneten Pflanzenschutz-Maßnahmen behandelt wurde, innerhalb kürzester Zeit total zerstören, wobei der Pilz sich über die gesamte Pflanze ausbreitet. Zum Nachweis von *Phytophthora infestans* im oberirdischen Teil der Kartoffelpflanze wurde eine neue Methode der Probenahme angewandt, mit der nur ein kleiner Teil des Stengels mittels einer großvolumigen Kanüle herausgestanzt wird. Da bei dieser Probenahme nur sehr geringe Mengen vom Stengel und somit des Pilzes entnommen werden, muß zum Nachweis von *Phytophthora infestans* eine spezielle Form der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die sogenannte „nested PCR“, verwendet werden. Diese Methode wird immer dann eingesetzt, wenn im

Untersuchungsmaterial extrem geringe Mengen des nachzuweisenden Mikroorganismus vermutet werden.

Bei der „nested PCR“ macht man sich bei *Phytophthora infestans* den Umstand zunutze, daß insgesamt zwei Primerpaare in einem PCR-Reaktionsgemisch eingesetzt werden können. Durch die Vorgabe von zwei zeitlich versetzten, unterschiedlichen Temperaturen im Thermozykler wird dann ein und dasselbe DNA-Fragment von *Phytophthora infestans* von jeweils einem Primerpaar vermehrt bzw. amplifiziert. Mit der Anwendung dieser Methode erhöht sich die Spezifität und Nachweisempfindlichkeit von *Phytophthora infestans*.

Der Einsatz der Kanülen-Ausstanzmethode sowie die Anwendung der „nested PCR“ wurde im Feld zum Nachweis von *Phytophthora infestans* an der anfälligen Kartoffelsorte „Sieglinde“ getestet. Parallel dazu wurde als Kontrolle ein Biotest der ausgestanzten Stengelteile an suberinisierten Kartoffelscheibchen durchgeführt, mit denen ein Aufwuchs von *Phytophthora infestans* als Pilzmyzel deutlich sichtbar gemacht werden kann.

Material und Methoden

Nach dem Auspflanzen der Kartoffelsorte „Sieglinde“ wurden am Kartoffelkraut im Freiland, kurz vor dem ersten sichtbaren Befall mit *Phytophthora infestans*, Proben aus dem Stengel gezogen. Dazu wurde vor eine Plastik-Einmalspritze eine Kanüle mit dem Durchmesser von 2,5 mm und einer Länge von 80 mm gesetzt, die vor jeder Probenahme durch Eintauchen in 96 % Alkohol und anschließendes Abflammen sterilisiert wurde. Danach wurde Luft in den Spritzenkörper gezogen. Der Stengel der Kartoffelpflanze wurde in der Mitte 1 cm oberhalb des Bodens mit der Kanüle durchstoßen. Das dann in der Kanülenspitze befindliche, ausgestanzte Gewebestück wurde durch Herauspressen der in der Spritze befindlichen Luft in ein leeres, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht. Nach der Desinfektion der Kanüle erfolgte am gleichen Stengel etwas oberhalb der ersten Anstichstelle eine zweite Probenahme und das Gewebestück wurde in ein neues Reaktionsgefäß hineingepreßt.

Mit der zweiten gezogenen Probe führten wir einen Biotest mit aufgeschnittenen und suberinisierten Kartoffelscheibchen durch, indem die Probe zwischen zwei Kartoffelscheibchen gelegt und dann 2 Tage bei 12 °C im Dunkeln in Feuchtkammern belassen wurde. Danach wurden die Kartoffelscheibchen aufgeklappt und für weitere 6 Tage bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Aus-

wertung erfolgte unter dem Binokular, wobei nach typischen Myzel- und Sporangienstrukturen von *Phytophthora infestans* Ausschau gehalten wurde.

Die andere im Reaktionsgefäß befindliche Stengelprobe wurde zur Extraktion von DNA nach einer modifizierten Methode von RAEDER und BRODA (1985) aufgearbeitet. Dazu gaben wir zur Probe 50 µl Extraktionspuffer sowie 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) und zerkleinerten den Extrakt mit einem für das Plastik-Reaktionsgefäß passenden Mörser. Der Extrakt wurde eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugieren bei 8000 × g für 5 min wurden 10 µl vom Überstand genommen und mit 20 µl einer 0,5-N-NaOH-Lösung bei 95 °C für 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe 10 bis 30 min auf Eis stehen gelassen und 20 µl davon mit 180 µl Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, mit 3%igem Rinderserum-Albumin versetzt, gut gemischt; 5 µl davon verwendeten wir zur Durchführung der „nested PCR“.

Das eine bei der „nested PCR“ verwendete Primerpaar ist bei NIEPOLD und SCHÖBER-BUTIN (1997) veröffentlicht und hat folgende Sequenzen: Pin 1 (20mer) 5' cga cga ggg ggc agg ggt tt 3' and Pin 2 (20mer): 5' ccg cct ggc tet cgc acg tc 3'. Im Gegensatz zur obigen Veröffentlichung wurden zwei neue 18mer-Primer verwendet mit den folgenden DNA-Sequenzen: Pi1a: 5' atc tgg cag ccc ccg att 3' and Pi2a: 5' tat ggg gcc gcg tac agc 3'. Diese neuen Sequenzen wurde mit dem Computerprogramm OLIGO 4.0-2019, Primer Analysis Software, 1989-91 by Wojciech Rychlik bestimmt. Alle verwendeten Primer ließen wir von der Fa. NAPS, Göttingen, synthetisieren.

Die „nested PCR“ wurde in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl durchgeführt, wobei sich der Reaktionsmix wie folgt zusammensetzte: 2,5 µl 10 × Polymerase-Puffer (wurde als MgCl₂-loser Puffer von der Fa. Perkin Elmer geliefert), 0,25 µl 100 mM MgCl₂, 0,5 µl Nukleotid-Mix, je 0,5 µl 10 mM der 4 Primer, 0,2 µl Taq-Polymerase (5–7 Einheiten/µl, Fa. Perkin Elmer), 14, 55 µl H₂O. Unmittelbar vor der PCR-Reaktion im Thermozykler erfolgte die Zugabe von 5 µl der extrahierten Stengel- bzw. Myzel-DNA.

Zur Durchführung der „nested PCR“ wurde der Thermozykler von der Firma JM Research Inc., PTC-100 wie folgt programmiert: 5 min bei 96 °C, dann 10 Zyklen zu 50 s bei 94 °C, 55 s bei 61 °C und 50 s bei 72 °C für das Primerpaar Pi1a und Pi2a, das das größere DNA-Fragment amplifizierte. Darauf folgten 35 Zyklen zu 50 s bei 94 °C, 55 s bei 64 °C und 50 s bei 72 °C. Hierbei wurde das kleinere DNA-Fragment amplifizierte. Am Ende erfolgte eine Inkubation bei 72 °C für 5 min, mit der alle amplifizierten DNA-Fragmente nochmals auf ihre vollständige Synthese überprüft wurden. Je ein Aliquot der Amplifikate (10 µl) wurde in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Als Längenstandard diente die 1-Kb-Plus-DNA-Leiter der Fa. GibcoBRL.

Ergebnisse und Diskussion

Die Kanülen-Extraktionsmethode erwies sich als geeignet zum Ausstanzen von Gewebe aus Kartoffelstengeln, ohne den Stengel – wie bei anderen Verfahren (ELISA) üblich – ganz abschneiden zu müssen. Die spitz angeschliffene Kanüle konnte unproblematisch sowohl Stengel junger Kartoffeltriebe als auch dickere, verholzte Stengel älterer Triebe durchdringen. Die zugefügten Wunden brauchten nicht verschlossen zu werden, da eine Wundheilung (Verholzung) schnell stattfand. Ein weiterer Vorteil dieser Probenahme war, daß die Wunden aus dem bodennahen Bereich in Folge des Streckungswachstums nach oben wuchsen, so daß der gleiche Stengel nach einer gewissen Zeit

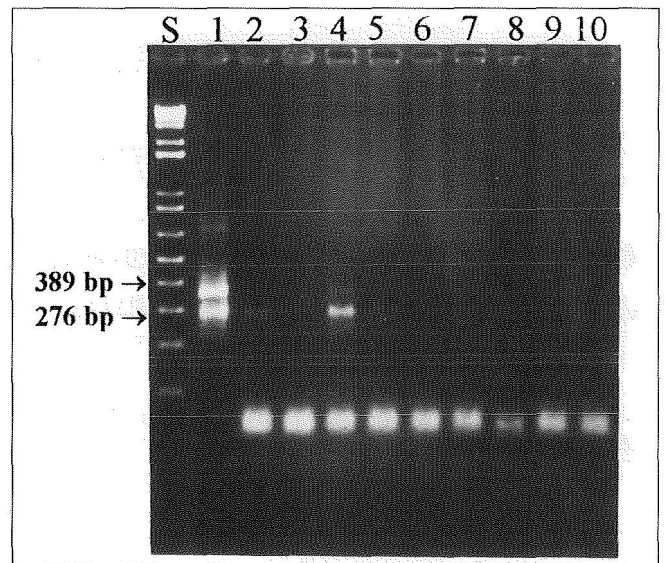


Abb. 1. „Nested PCR“ von Stengelproben aus Kartoffelpflanzen, die im Feld kurz vor dem Auftreten einer *Phytophthora infestans*-Epidemie gezogen wurden. Spur 1 zeigt die positive Kontrolle von DNA, extrahiert aus *Phytophthora infestans*-Myzel. Spur 4 entspricht dem Stengel, dessen zweite Probenahme auch positiv im Biotest war. Die schwächer positiven Banden der Spuren 2 und 5 zeigten im Biotest keinen Auswuchs von typischem *Phytophthora infestans*-Myzel. Spur 10 repräsentiert die negative Wasserkontrolle. Als Längenstandard wurde der 1-kb-Plus-Standard der Fa. GibcoBRL aufgetragen (Spur 1). Die am unteren Ende des Bildes befindlichen DNA-Banden repräsentieren nichtverbrauchte Primerpaare.

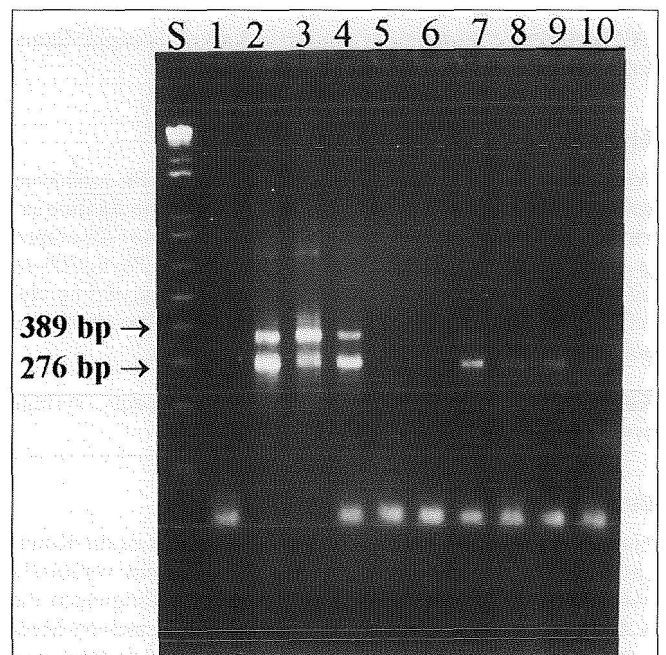


Abb. 2. „Nested PCR“ von weiteren Stengelproben aus Kartoffelpflanzen, die im Feld kurz vor dem Auftreten einer *Phytophthora infestans*-Epidemie gezogen wurden. Die Spuren 2 und 3 zeigen die positive Kontrolle von DNA, extrahiert aus *Phytophthora infestans*-Myzel. Die Spuren 4 bis 10 repräsentieren Probenahmen aus verschiedenen Kartoffelpflanzen, mit unterschiedlichem Befall von *Phytophthora infestans*. Keine der gezogenen Stengelproben zeigte im Biotest ein typisches *Phytophthora infestans*-Myzelwachstum. Der 1-kb-Plus-Längenstandard der Fa. GibcoBRL ist auf Spur 1 aufgetragen, und die negative Wasserkontrolle befindet sich auf Spur 2. Die am unteren Ende des Bildes befindlichen DNA-Banden repräsentieren nichtverbrauchte Primerpaare.

noch einmal beprobt werden konnte. Somit läßt sich in Zukunft ein Wachstum von *Phytophthora infestans* im Laufe der Vegetationsperiode am gleichen Stengel verfolgen.

Die Extraktion der DNA aus dem Stengelmaterial der natürlich im Feld infizierten Kartoffelpflanzen und der Nachweis mit der sogenannten „nested PCR“ – bei Verwendung der neuen Primer Pi1a und Pi2a – erwies sich als erfolgreich. Das mit diesem neuen Primerpaar amplifizierte DNA-Fragment hatte nunmehr eine Größe von 389 bp. Die dann im zweiten Abschnitt der „nested PCR“ benutzten Primer amplifizierten ein kleineres DNA-Fragment mit der Größe von 276 bp.

Bei einer hohen Ausgangskonzentration der *Phytophthora infestans*-DNA waren beide Amplifikate der zwei Primerpaare sichtbar (Abb. 1, Spur 1). Bei niedrigeren Konzentrationen der *Phytophthora infestans*-DNA ist nur noch das kleinere DNA-Fragment (276 bp, Abb. 1, Spur 4) sichtbar. Die Empfindlichkeit lag, ähnlich wie bei NIEPOLD und SCHÖBER-BUTIN (1997) beschrieben, bei 10–5 ng Myzelgewicht (Ergebnisse unveröffentlicht).

Zur Überprüfung der Probenahmetechnik sowie der Extraktion und „nested PCR“ wurden mehrere Stengel von verschiedenen Kartoffelpflanzen kurz vor dem Start der *Phytophthora*-Epidemie beprobt und untersucht. Dabei zeigte sich, daß in einem Fall eine Korrelation eines relativ starken PCR-Signals und des Aufwuchses von *Phytophthora infestans* im Biotest hergestellt werden konnte (Abb. 1 zeigt das PCR-Signal auf Spur 4).

Allerdings gab es auch Beprobungen, die eine geringere Intensität des PCR-Signals aufwiesen, wie in Abbildung 1, Spur 2 und 5 zu sehen ist. Hier fand kein Aufwuchs des Pilzes im Biotest statt.

Ebenso traten auch Fälle auf, bei denen ein ebenso starkes PCR-Signal wie in Abbildung 1, Spur 4 auftrat, im Biotest aber kein Pilzwachstum nachzuweisen war (Abb. 2). Hierbei könnte der Fall eingetreten sein, daß zwar die Probenahme für die „nested PCR“ Pilzmaterial von *Phytophthora infestans* enthielt, sich aber in der anderen Probenahme oberhalb der ersten Einstichstelle im gleichen Stengel kein Myzel mehr befand. Der Grund dafür mag die wahrscheinlich ungleichmäßige Verteilung des Myzels von *Phytophthora infestans* im Stengel sein. Da die gezogene Probe nur einen Ausschnitt aus dem Stengel darstellt, muß also immer damit gerechnet werden, daß das Myzel gerade nicht an der Probenahme-Stelle gewachsen ist, sondern links oder rechts daneben. Ist das der Fall, kann der Pilz natürlich weder im Biotest noch in der PCR nachgewiesen werden.

Auf der anderen Seite zeigten alle bisher gemachten Erfahrungen mit dem Biotest, daß beim Vorhandensein nur einer lebensfähigen Zoospore oder eines noch so kleinen, aber lebensfähigen Myzelstückes ein Aufwuchs von *Phytophthora infestans* jedesmal gewährleistet war (SCHÖBER-BUTIN, unveröffentlicht).

So können die in Abbildung 2 in der „nested PCR“ gefundenen positiven Signale dahingehend interpretiert werden, daß eine zweite Probenahme so gesetzt wurde, daß *Phytophthora infestans* im Stengel von der Kanüle nicht mehr „getroffen“ wurde und somit im Biotest nicht mehr auswachsen konnte. Eine zweite Möglichkeit könnte auch ein vorzeitiges Absterben des Pilzes in dem kleinen Gewebestück sein, verursacht durch die Transportdauer vom Feld bis ins Labor, da die Proben trocken im Plastikreaktionsgefäß aufbewahrt wurden.

Um diese Probleme bei einer erneuten Probenahme aus dem Stengel von Kartoffelpflanzen zu unterbinden, könnten die je zwei pro Stengel gezogenen Gewebeprobe unmittelbar nach Probenahme in Puffer gegeben und danach im Labor zerkleinert und gemischt werden. Die eine Hälfte des Gemisches würde zur weiteren DNA-Extraktion verwendet werden, während mit der anderen der Biotest durchgeführt werden könnte.

Um zusätzlich auch eine möglichst große Trefferquote des Pilzmyzels im Stengel zu erreichen, sollten die beiden Einstiche im Winkel von 90° versetzt erfolgen. Mit der Kanüle sollte aber nicht zu dicht übereinander angestochen werden, weil dann die Festigkeit von beispielsweise jungen Stengeln nach einer Beprobung nicht mehr gewährleistet sein kann.

Versuche dieser Art sind während der Vegetationsperiode im Jahr 2000 geplant, um so das Wachstum von *Phytophthora infestans* im Stengel zu verfolgen und eventuell frühzeitig Hinweise auf die Entstehung einer Epidemie liefern zu können.

Literatur

- NIEPOLD, F., B. SCHÖBER-BUTIN, 1997: Application of the one-tube PCR technique in combination with a fast DNA extraction procedure for detecting *Phytophthora infestans* in infected potato tubers. *Microbiological Research* **152**, 345–351.
 RAEDER, U., P. BRODA, 1985: Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* **1**, 17–20.

Zur Veröffentlichung angenommen: 18. August 1999

Kontaktanschrift: Privatdozent Dr. Frank Niepold, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig