

29-3 - Ali, A.; Wolf, P. F. J.; Verreet, J.-A.

Christian-Albrechts-Universität Kiel

## Schnelltest und Quantifizierung von *Cercospora beticola* im Boden mittels PCR und ELISA

*Rapid detection and quantification of Cercospora beticola in soil using PCR and ELISA assays*

Die *Cercospora*-Blattfleckenkrankheit (CLS) gilt als die häufigste und destruktivste Blattkrankheit im Zuckerrübenanbau weltweit. Ziel dieser Arbeit war es, effektive Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *C. beticola* im Boden zu entwickeln, da es einerseits zu klären galt, inwieweit die Überdauerungsfähigkeit *Cercospora*-spezifischen pilzlichen Stromas als Ausgangsinokulum für den frühen Befall mit Beginn des Reihenschlusses von Bedeutung ist, andererseits der frühzeitige Nachweis des Erregers als bodenbürtiges Ausgangsinokulum einen wichtigen Faktor für die Vorhersage dieser Krankheit darstellen kann. Es wurden zwei diagnostische Methoden, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie ELISA-Technik, erfolgreich für den qualitativen und quantitativen Nachweis von *C. beticola* im Boden entwickelt und angewendet. Die Identifizierung von *C. beticola*-spezifischen Sequenzen erfolgte mit Hilfe der NCBI-GenBank-Website, auf der drei Sequenzen identifiziert wurden. Eine 469-bp rDNA-Sequenz, eine 967-bp Cytochrom b (cytb) mRNA-Sequenz und ein 1195-bp-Aktin Gen. Drei Primer-Sets wurden basierend auf diesen Sequenzen mit Hilfe des Internetprogramms Primer 3 entwickelt: ITS3/ITS4, Cyt-F/Cyt-R und Cb-actinF1/Cb-actinR2. Ein primärer Spezifitätstest für diese drei Primer-Paare wurde mit drei *C. beticola*-Isolaten durchgeführt. Die drei Primer-Paare amplifizierten jeweils ein Fragment aus den *C. beticola*-Isolaten mit verschiedenen Fragmentgrößen: 798 bp für Cb-actinF1/Cb-actinR2, 243 bp für Cyt-F/Cyt-R und 223 bp für ITS3/ITS4. Die drei Primer-Sets wurden dann auf ihre Spezifität untersucht und mit 28 anderen pilzlichen Krankheitserregern kreuzgetestet. Die beiden Primer-Paare ITS3/ITS4 und Cb-actinF1/Cb-actinR2 waren sehr spezifisch, da sie nur ein einziges Fragment der *C. beticola*-Isolate amplifizierten, nicht aber von den anderen 28 getesteten pilzlichen Pathogenen. Das Primer-Paar Cyt-F/Cyt-R zeigte ebenfalls eine hohe Spezifität, jedoch wurde auch bei *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* ein PCR-Produkt amplifiziert. Die beiden Primer-Sets ITS3/ITS4 und Cb-actinF1/Cb-actinR2 wurden dann auf ihre Spezifität mit 25 *C. beticola*-Isolaten aus Deutschland, Ägypten und den USA getestet. Die zwei entwickelten Primer-Sets amplifizierten jeweils ein deutliches Amplifikat aus allen *C. beticola*-Isolaten. Lediglich ein Isolat (Isolat C2) zeigte unter Verwendung des Primer-Sets Cb-actinF1/Cb-actinR2 eine schwache Bande. Für den Sensitivitätstest der zwei entwickelten Primer-Paare wurden drei verschiedene Zyklenzahlen für die konventionelle PCR verwendet: 28, 35 und 40 Zyklen. Das Primer-Paar ITS3/ITS4 zeigte eine hohe Empfindlichkeit der Detektion, da lediglich 0,5 pg genomischer DNA von *C. beticola* detektiert werden konnte, während mit dem Primer-Paar Cb-actinF1/Cb-actinR2 minimal 10 pg genomischer DNA mit der konventionellen PCR nachgewiesen wurden.

Für den Nachweis von *C. beticola* Antigenen wurden spezifische monoklonale Antikörper (mAk) unter Verwendung der Methode von Köhler und Milstein (1975) im Institut für Biochemie, Universität Kiel, hergestellt. Achtzehn Klone wurden auf ihre Spezifität mittels ELISA gegen *C. beticola* und einige andere Pilzarten (*Chaetomium* spp., *Fusarium acufiformis*, *F. sporotrichioides*, *Pytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*) getestet. Alle Antikörper-Klone zeigten lediglich positive Ergebnisse mit *C. beticola*, während die Ergebnisse mit den anderen getesteten Pilzspezies negativ waren, was auf die Spezifität dieser Antikörper für *C. beticola* hinweist.

Nach der Entwicklung und Erprobung der Nachweismethoden unter kontrollierten Bedingungen mit bekannten Inokulum-Mengen, wurden diese Methoden für Bodenproben von verschiedenen Schlägen und Standorten angewendet. Die Bodenproben wurden aus zwei Regionen in Deutschland, Bayern und Niedersachsen, sowie einer Region in Montana (USA) entnommen. Auf den beprobten Feldern wurden verschiedene Bodenbearbeitungsverfahren und Fruchtfolgen durchgeführt. Die Probenahme erfolgte aus drei verschiedenen Bodenschichten: 0 - 5 cm, 5 - 15 cm und 15 - 30 cm.

*C. beticola* konnte anhand beider entwickelter Verfahren selbst im 4. Fruchtfolgejahr auch in tieferen Bodenschichten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse, die eine Erkenntnislücke im Lebenszyklus des Erregers schließen, werden dargestellt und diskutiert.