

Methodenvergleich: Grow-Out versus PCR, am Beispiel der Prüfung von Feldsalatsaatgut auf *Peronospora valerianellae*

Einleitung

Der Falsche Mehltau des Feldsalates ist ein sautgutbürtiger Erreger, der in ökologisch wirtschaftenden Betrieben regelmäßig für massive Ertragsausfälle verantwortlich ist (Penzkofer 2008). Um eine sichere Produktion zu gewährleisten ist pathogenfreies Saatgut notwendig, jedoch in der Praxis nicht realisierbar. Im Rahmen der Saatgutgewinnung werden daher dekontaminierende Massnahmen ergriffen, die jedoch kostenintensiv und zeitaufwendig sind. Bevor das Saatgut aber behandelt wird, sollte es auf Pathogen-Befall untersucht werden, um entscheiden zu können, ob eine solche Saatgutbehandlung überhaupt notwendig ist. Die bisher zur Verfügung stehenden Möglichkeiten um Feldsalat-Saatgut auf *Peronospora*-Befall zu testen sind die Oosporen-Abwasch-Methode (ISTA 1984), sowie ein standardisierter Grow-Out-Test (Guenard et al. 2002). Beide Methoden konnten in der Vergangenheit das Auftreten von Infektions-Ereignissen nicht verhindern. Zu Verbesserung dieser Situation wurden die Methoden verglichen, sowie ein PCR-gestützter Nachweis entwickelt und dessen Praxistauglichkeit geprüft.

Methoden

Grow-Out-Test:

100 Samen werden in vier Wiederholungen in Kisten mit einem Substratgemisch aus 2/3 Erde und 1/3 Sand gesät und mit durchsichtigen Hauben abgedeckt. Die Inkubation erfolgt bei 12 °C ± 3 °C während 28 Tagen. Jeder Keimling wird nach 21 d und 28 d auf Sporulation an den Keimblättern untersucht. Für qualitative Ergebnisse reicht ein Auszählen der befallenen Samen nach 21 d, wenn bis dahin eine Sporulation sichtbar war. Für quantitative Resultate werden die Keimlinge nach 28 d auf Sporulation untersucht.

PCR-gestützter Nachweis:

Für die Entwicklung von artspezifischen DNA-Markern wurden die Sporangien verschiedener Feldisolate von *P. valerianellae* eingesetzt. Mit der von PathoScan entwickelten Methode konnten innerhalb von zwei Monaten zwei Primerpaare identifiziert werden, die keinerlei Kreuzreaktion mit naheverwandten Oomyceten sowie verschiedenen Feldsalatproben aus konventionellem Anbau zeigten.

Für den Praxistest wurden die DNA aus 400 Früchten extrahiert. Der anschließend durchgeführte PCR-gestützte Nachweis von *P. valerianellae* erfolgte mit den artspezifischen Primerpaaren.

Ergebnisse

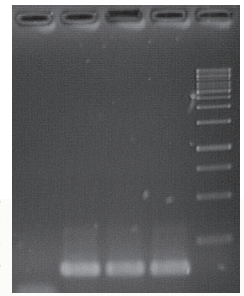
Mit dem Grow-Out-Test konnten Partien mit Befallsgraden von 20 %, 10 % oder 5 % deutlich identifiziert werden. Ein Befallsgrad von 1% lag an der Nachweisgrenze. In einzelnen Wiederholungen und in einzelnen Testserien konnte kein Befall beobachtet werden. Durch die Versuche mit elf unterschiedlich stark kontaminierten Feldsalat-Saatgutposten mit Hilfe des Grow-Out-Tests konnte festgestellt werden, dass diese Methode für den Nachweis schwach verseuchter Saatgutposten unzureichend ist und nur durch eine Verlängerung der Versuchsdauer und eine Erhöhung der Probenmenge verlässlichere Aussagen über eine Kontamination mit *P. valerianellae* gemacht werden können (erweiterter Grow-Out-Test).

Für den PCR-gestützten Nachweis wurden 7 Saatgutposten herangezogen, die im Grow-out-Test negativ waren (Befallsrate < 1 %). Es zeigte sich, dass 6 Posten eindeutig kontaminiert waren.



Sporulation von *P. valerianellae* während eines Grow-Out-Tests.

Der Grow-Out-Test ermöglicht einen quantitativen Aktivitätsnachweis.



Der PCR-gestützte Nachweis von *P. valerianellae* ermöglicht eine schnelle und empfindliche Saatgut-Prüfung.

Artspezifische PCR-Fragmente von *P. valerianellae* getrennt in einem 1,5 % Agarosegel.

Tabelle 1: Vergleich der Resultate des Grow-Out-Tests mit Ergebnissen der PCR-Analyse an verschiedenen Posten von Feldsalat-Saatgut.

Saatgut-Partien	Befall im Standard Grow-Out	Befall im erweitertem Grow-Out	Nachweis mit PCR-gestütztem Verfahren
P1	Nein	Nicht getestet	Nein
P2	Nein	Ja	Nicht getestet
P3	Nein	Ja	Nicht getestet
P4	Nein	Ja	Ja
P5	Ja	Ja	Ja
P6	Nein	Nein	Ja
P7	Ja	Ja	Ja
P8	Nein	Nein	Ja
P9	Ja	Ja	Ja
P10	Ja	Ja	Nicht getestet
P11	Ja	Ja	Nicht getestet

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, drei verschiedene Methoden der Gesundheitsprüfung (Oosporen-Abwasch-Methode [Daten nicht dargestellt], Grow-out-Test, PCR-gestützter Nachweis) von Feldsalatsaatgut hinsichtlich der Nachweisgrenze, Sicherheit der Resultate und Kosten der Untersuchungen zu vergleichen. Als einzige Methode konnte mit dem PCR-gestützten Test die geforderte Nachweisgrenze von < 1 % Kontamination erreicht werden. Da für den PCR-gestützten Test DNA eingesetzt wird, kann bisher keine Aussage über die tatsächliche Infektionswahrscheinlichkeit getroffen werden, hier ist der Grow-out-Test deutlich im Vorteil. Diese Lücke soll zukünftig durch die Entwicklung eines ergänzenden molekularbiologischen Aktivitätstest geschlossen werden.

Literatur

- ISTA (1984): Handbook on seed health testing. Working sheet No. 51 Corn salad (*Valerianella locusta*), mildew (*Peronospora valerianellae* Fuckel)
- Penzkofer, M. (2008): Falscher Mehltau (*Peronospora valerianella* Fuckel) an Feldsalat (*Valerianella locusta* (L.) Laterr.): Nachweis auf schwach verseuchten Saatgutposten und Einfluss von Anzuchtbedingungen auf den Keimlingsbefall. – Diplomarbeit TU München-Weihenstephan.
- Guenard, M., de Vogel R., Olivier V., Koenadt H., de Koning J., Wijkamp I. and Seradat I. (2002) Detection of viable *Peronospora valerianellae* in corn salad seeds. 4th ISTA-PDC Seed Health symposium. Wageningen. The Netherlands