

Pathogen-Diagnostik

PCR-gestützter Nachweis von pflanzenparasitären Nematoden

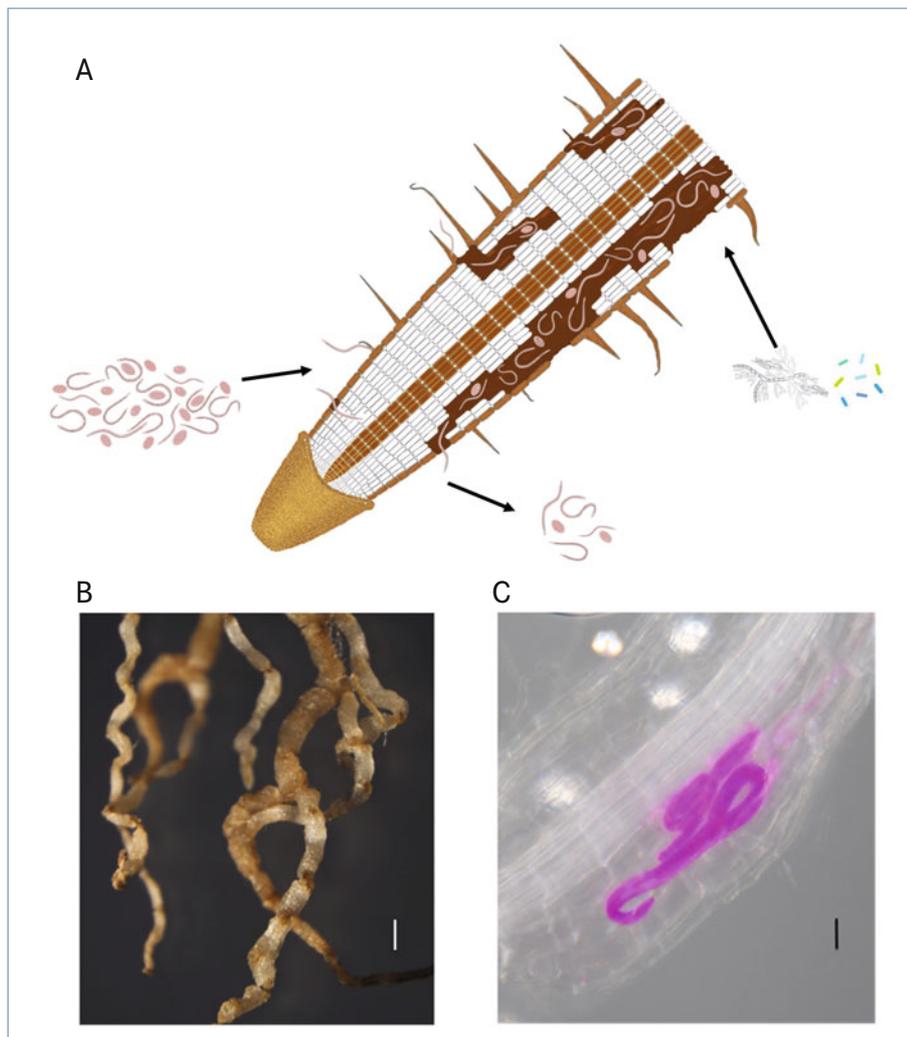
EHSAN FATEMI, CHRISTIAN JUNG
INSTITUT FÜR PFLANZENBAU UND PFLANZENZÜCHTUNG, UNIVERSITÄT ZU KIEL

Root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* pose a threat to global cereal production. The traditional identification by counting nematodes under the microscope is laborious and time-consuming. We have established a protocol for quantifying nematodes within cereal roots by RT-qPCR. This method holds promise in selecting resistant plant genotypes among large populations during plant breeding programs.

DOI: 10.1007/s12268-024-2181-2
© Die Autoren 2024

■ Nematoden gehören zum Stamm der Fadenwürmer, der mehrere Millionen Arten umfasst. Sie sind sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Umwelten zu finden. Freilebende Nematoden leisten als Destruenten einen signifikanten Beitrag zum Nährstoffkreislauf. Ewa 60 % leben parasitär in Pflanzen und Tieren. Pflanzenparasitäre Nematoden sind bedeutende Schädlinge, die in Landwirtschaft und Gartenbau zu erheblichen Ertragsverlusten und Qualitätseinbußen führen. Die durch pflanzenparasitäre Nematoden verursachten jährlichen Verluste werden weltweit auf 15 % der globalen Ernte geschätzt [1, 2].

Etwa 4.100 pflanzenparasitäre Nematoden sind bisher beschrieben worden, von denen nur eine kleine Anzahl signifikante wirtschaftliche Verluste verursacht. Dazu gehören sedentäre Nematoden wie Zysten-Nematoden (Gattungen *Heterodera* und *Globodera*), Wurzelgallen-Nematoden (*Meloidogyne*) sowie freilebende Nematoden (*Pratylenchus*). Wurzelgallen- und Zysten-Nematoden sind in der Lage, komplexe Strukturen innerhalb der Pflanze zu induzieren, die zu ihrer Ernährung und Fortpflanzung dienen. Weiterhin können pflanzenparasitäre Nematoden als Teil eines Krankheitskomplexes Eintrittspforten für andere Pathogene bilden und so den Schaden noch verstärken [2, 3].



◀ **Abb. 1:** Lebenszyklus von Wurzelläsionsnematoden in Getreidepflanzen. **A,** Infektionszyklus von Wurzelläsionsnematoden. Nematoden dringen in die Wurzeln ein und parasitieren in der Wurzelrinde. Sie entwickeln sich innerhalb der Wurzel weiter und legen dort Eier. An den Läsionen kommt es zu Zweitinfektion durch Pilze und Bakterien. Am Ende können die Nematoden die stark geschädigte Wurzel wieder verlassen, um andere Pflanzen zu infizieren. **B,** infizierte Gerste-Wurzel. Dunkle Bereiche innerhalb der infizierten Wurzeln rühren von geschädigten Zellen her (Maßstab: 10 mm). **C,** Mit Fuchsin-Lösung gefärbte Wurzel, in der zwei Nematoden durch ihre rosa Färbung erkennbar sind (Maßstab: 100 µm).

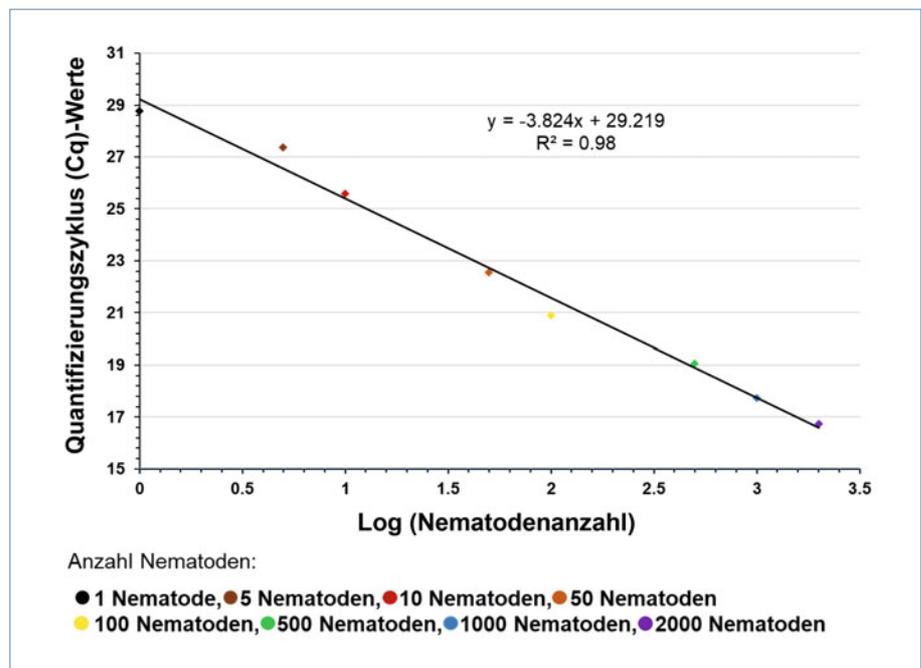
WurzelläSIONsnematoden als bedeutende Schädlinge in der Pflanzenproduktion

Nematoden der Gattung *Pratylenchus* werden auch als WurzelläSIONsnematoden bezeichnet. Sie besitzen ein breites Wirtsspektrum und sind sowohl in kühlen, gemäßigten als auch in tropischen Regionen verbreitet [1]. *Pratylenchus neglectus* ist global in Getreide- und anderen Kulturarten verbreitet. Dort verursachen sie hohe wirtschaftliche Verluste. Auch in Deutschland erlangt dieser Schädling bedingt durch enge Fruchtfolgen zunehmende Bedeutung. Als obligate Endoparasiten schädigen sie das Wurzelsystem, was oberirdisch zu Chlorosen, Welken und Wachstumsstörungen führt. Nach dem Eindringen in die Wurzel parasitieren die Nematoden das Rindengewebe. Sie durchlaufen mehrere Larvenstadien und legen Eier ab. Im Gegensatz zu sedentären Nematoden können sie die Wurzel auch wieder verlassen, um in andere Wurzeln einzudringen. An den Wurzeln entstehen Risse und Läsionen, die den Eintritt anderer Schadorganismen begünstigen und zum Absterben der Wurzeln führen können (Abb. 1). Die Nematoden können innerhalb der infizierten Wurzel durch Färben mit Fuchsin-Lösung sichtbar gemacht werden. Die wirtschaftliche Bedeutung von WurzelläSIONsnematoden wird oft unterschätzt, weil ihr Nachweis im Boden und in der Pflanze äußerst schwierig ist.

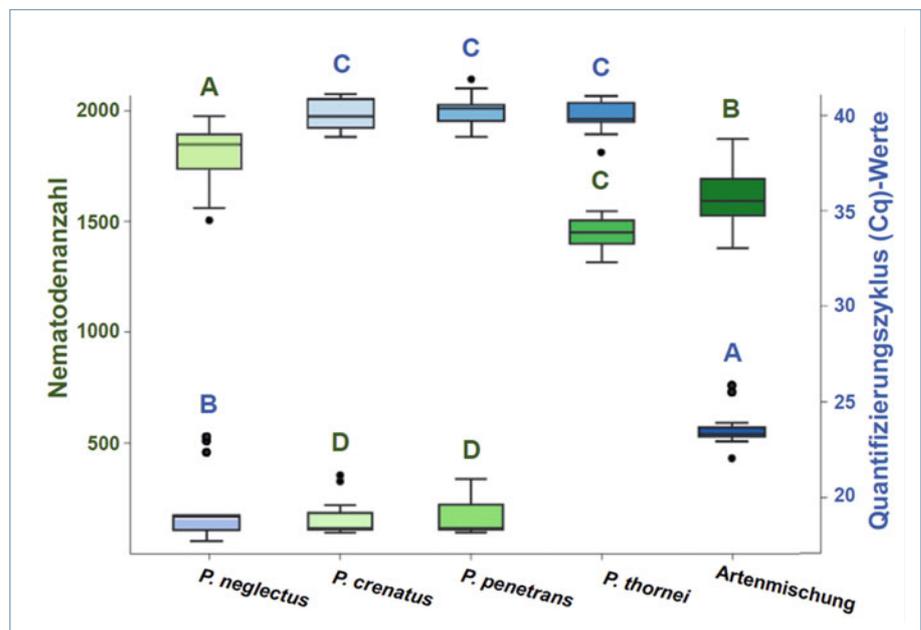
Mikroskopischer Nachweis von WurzelläSIONsnematoden

Der quantitative Nachweis erfolgt traditionell durch Zählen der Nematoden unter dem Mikroskop. Da es nicht möglich ist, die Nematoden innerhalb der Pflanze zu zählen, müssen diese zunächst dazu gebracht werden, die Wurzel zu verlassen. Dazu werden die abgetrennten Wurzeln gewaschen und über mehrere Tage hoher Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Dies regt die Nematoden zum Verlassen der Wurzel an, sodass sie in Wasser gesammelt und unter dem Mikroskop gezählt werden können. Noch schwieriger ist die taxonomische Bestimmung der Nematoden-Arten unter dem Mikroskop, die nur von wenigen Fachleuten beherrscht wird.

Unser Ziel war es daher, den quantitativen und qualitativen Nachweis freilebender Nematoden zu vereinfachen, indem deren DNA innerhalb der Wurzel nachgewiesen wird.



▲ Abb. 2: Regressionskurve mit Quantifizierungszyklus (Cq)-Werten nach Durchführung einer RT-qPCR. DNA wurde aus ein bis 2.000 Nematoden unter Verwendung der *neg 1*-Primerkombination isoliert.



▲ Abb. 3: Korrelation zwischen der Anzahl ausgezählter Nematoden aus zuvor infizierten Gerstewurzeln (grün) und dem quantitativen DNA-Nachweis mittels RT-qPCR (blau). Pflanzen wurden mit je 1.000 Nematoden verschiedener *Pratylenchus*-Arten infiziert. Nach acht Wochen wurden die Wurzeln geerntet. Aus einem Teil wurde DNA isoliert, während in dem anderen Teil die Nematoden gezählt wurden. Der ANOVA-Test ($p < 0,05$) wurde durchgeführt, gefolgt von einem Tukey-Test ($p < 0,05$), um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen. Unterschiedliche Buchstaben über den Fehlerbalken repräsentieren Gruppen, basierend auf ihrer Signifikanz.

Das RT-qPCR-basierte Nachweissystem

Wir haben zunächst alle verfügbaren *Pratylenchus*-DNA-Sequenzdaten ausgewertet.

Daraus wurden artspezifische Primer-Kombinationen für die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) selektiert. Danach wurde ein Protokoll für die Extraktion von

Nematoden-DNA aus infizierten Getreidewurzeln optimiert. Die PCR mit der Primer-Kombination *neg1* führte zu einer *P. neglectus*-spezifischen DNA-Amplifikation. Nach Auftrennung im Agarose-Gel wurde eine einzige Bande sichtbar. Andere Primer erwiesen sich aufgrund von Sekundärstrukturen und unspezifischer Amplifikation als ungeeignet [4].

Der anschließende quantitative Nachweis von *P. neglectus* erfolgte mit isolierten Nematoden oder mit infizierten Getreidewurzeln. Zunächst wurden serielle Verdünnungen von *P. neglectus*-DNA durchgeführt. Ein bis 2.000 *P. neglectus*-Nematoden wurden unter Verwendung eines Stereomikroskops gesammelt. Die DNA wurde aus Wurzeln isoliert und mit der spezifischen Primer-Kombination mittels RT-qPCR amplifiziert. Als Ergebnis wurde eine breite Spanne hinsichtlich des Übergangs in die exponentielle Phase beobachtet. Die C_q-Werte reichten von 28,8 für einen einzigen bis 16,7 für 2.000 Nematoden. Die lineare Regression zeigte eine negative Korrelation zwischen den C_q-Werten und der Anzahl an Nematoden ($R^2 = 0,98$, **Abb. 2**). Dies bestätigte die Eignung der *neg1*-Primerkombination zum quantitativen Nachweis von *P. neglectus*.

Als nächsten Schritt führten wir den quantitativen Nachweis von *P. neglectus* in zuvor infizierten Getreidepflanzen durch. Die Pflanzen wurden entweder getrennt mit vier verschiedenen *Pratylenchus*-Arten oder gemeinsam mit einem Gemisch aller Arten infiziert. Nach acht Wochen wurden die Nematoden in den Wurzeln nach der traditionellen Methode ausgezählt. Die Anzahl an Nematoden reichte von 1.856 bis 15.461 (**Abb. 3**). In den ausschließlich mit *P. neglectus* infizierten Pflanzen wurden die meisten Nematoden gezählt, während Pflanzen, die nur mit *P. crenatus* und *P. penetrans* infiziert worden waren, weniger Nematoden aufwiesen. Die anschließende RT-qPCR bestätigte den Zusammenhang zwischen der Anzahl Nematoden in der Wurzel und dem quantitativen DNA-Nachweis (**Abb. 3**). Es wurde eine hohe negative Korrelation zwischen den C_q-Werten und der Anzahl der Nematoden berechnet. Der RT-qPCR-Nachweis, unter Verwendung der *neg1*-Primerkombination erwies sich somit als geeignet zur Quantifizierung von *P. neglectus* in infizierten Getreidewurzeln.

Somit ist das RT-qPCR-Nachweissystem eine sowohl einfache als auch sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung

von *P. neglectus* in Getreidewurzeln. Diese Methode ist weitaus einfacher und kostengünstiger als das traditionelle Auszählen der Nematoden unter dem Mikroskop. Sie ermöglicht den Nachweis von Nematoden in Getreidewurzeln aus landwirtschaftlichen Produktionsflächen. Darüber hinaus ist sie für die Selektion resistenter Pflanzen in umfangreichen Populationen bedeutsam, wie sie im Rahmen der Pflanzenzüchtung durchgeführt wird. Sie ist somit ein wichtiges Werkzeug zur Züchtung resistenter Sorten. ■

Literatur

- [1] Castillo P, Vovlas N (2007) *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. In: Hunt DJ, Perry RN (Hrsg.) *Nematology Monographs and Perspectives*, Vol. 6., Brill, Leiden, Niederlande
- [2] Bernard GC, Egnin M, Bonsi C (2017) The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. In: Shah MM, Mahmood M (Hrsg.) *Nematology Concepts, Characteristics and Control*. London, InTech, 121–151

[3] Pires D, Vicente CSL, Menéndez E et al. (2022) The Fight against Plant-Parasitic Nematodes: Current Status of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents. *Pathogens* 11: 1178

[4] Fatemi E, Melzer S, Jung C (2023) DNA-based assessment of root lesion nematode infections in cereal roots. *Sci Rep* 13: 12602

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christian Jung
 Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 Olshausenstraße 40
 D-24118 Kiel
 c.jung@plantbreeding.uni-kiel.de
 www.plantbreeding.uni-kiel.de

AUTOREN



Ehsan Fatemi

2009–2013 Bachelorstudium in Pflanzenschutz und Phytopathologie, Universität Schiras, Iran. 2014–2016 Masterstudium in Phytopathologie und Pflanzen-Nematologie, Universität Schiras, Iran. 2019–2024 Doktorand und Promotion im Fach Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Universität zu Kiel. Seit 2024 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung an der Universität zu Kiel.



Christian Jung

1976–1984 Studium der Agrarwissenschaften und Promotion zum Dr. sc. agr. an der Universität Göttingen. 1984–1986 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Angewandte Genetik, Universität Hannover. 1987–1993 Akademischer Rat am Lehrstuhl I des Botanischen Instituts der Universität München. 1992 Habilitation zum Dr. rer. nat. habil im Fach Botanik. Seit 1993 Professor und Direktor am Institut für Pflanzenzüchtung der Universität zu Kiel.

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer