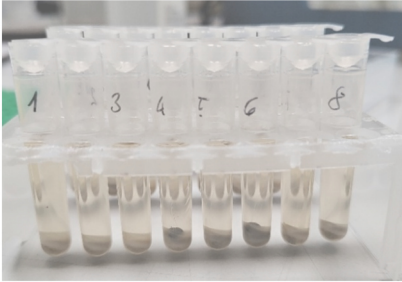


Nachweis von Flugbrand in Gerstensamen und der entsprechende Infektionsgrad im Feld



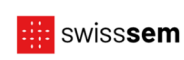
Cecilia Panzetti

Molekulare Ökologie (Agroscope), Evolutionsgenetik (Universität Neuchâtel)

Datum: 12 Januar 2024



www.agroscope.ch | gutes Essen, gesunde Umwelt

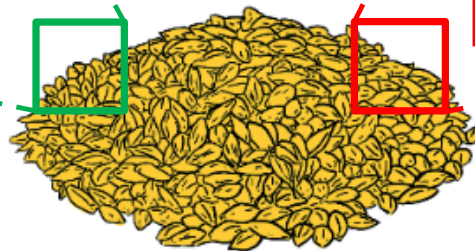
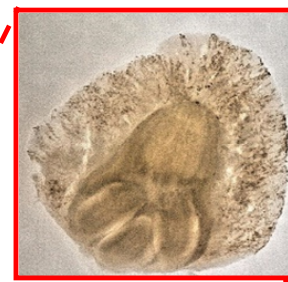


Einführung – Flugbrand (*Ustilago nuda*)

Gesunder
Gerstenembryo



Mit *Ustilago nuda*
infizierter Gerstenembryo



🇨🇭 Einführung – Flugbrand (*Ustilago nuda*)

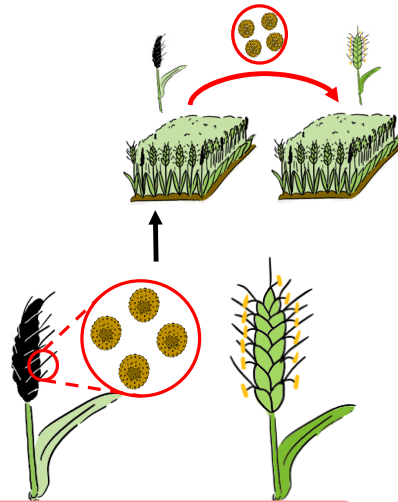
Gesunder Gerstenembryo



Mit *Ustilago nuda* infizierter Gerstenembryo



Krankheit wird nur durch Samen übertragen



Symptome nur an den Ähren sichtbar



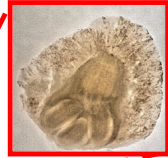
Infektion nur während der Blüte

🇨🇭 Einführung – Flugbrand (*Ustilago nuda*)

Gesunder Gerstenembryo



Mit *Ustilago nuda* infizierter Gerstenembryo



Prophylaktische Behandlung von Saatgut mit **synthetischen** Pflanzenschutzmitteln

+

Resistenz gegen synthetische Fungizide



Keine alternative Behandlung vermarktet



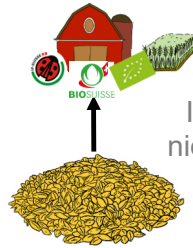
Unbehandeltes Saatgut

🇨🇭 Zertifiziertes Saatgut und Flugbrandbefall

Feldüberwachung

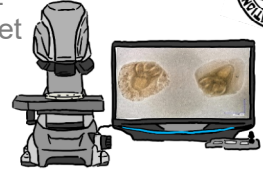


5 $\frac{\text{\#befallene Ähren}}{100 \text{ m}^2}$



In der Schweiz
nicht angewendet

Embryotest



1 $\frac{\text{\#befallener Embryo}}{1000 \text{ Embryonen}}$

≈ 30 $\frac{\text{\#befallene Ähren}^*}{100 \text{ m}^2}$

Probleme dieser Methoden:

- Infektionen sind schwierig zu erkennen
- Zeitaufwändig
- Sensibel auf Umwelteinflüsse
- Nicht im grossen Massstab anwendbar

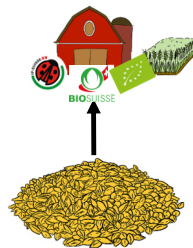
Wie kann der Nachweis erleichtert werden ?

* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$

Feldüberwachung



5 $\frac{\text{\#befallene Ähren}}{100 \text{ m}^2}$



Ziele

- Zeitsparend
- Anwendung in grossem Massstab

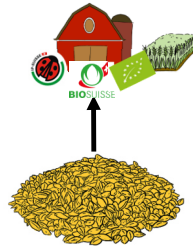
🇨🇭 Zertifiziertes Saatgut und Flugbrandbefall

🇨🇭 Zertifiziertes Saatgut und Flugbrandbefall

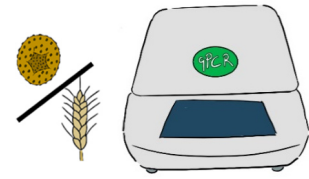
Feldüberwachung



5 #befallene Ähren
100 m²



Molekularer Nachweis



Ziele

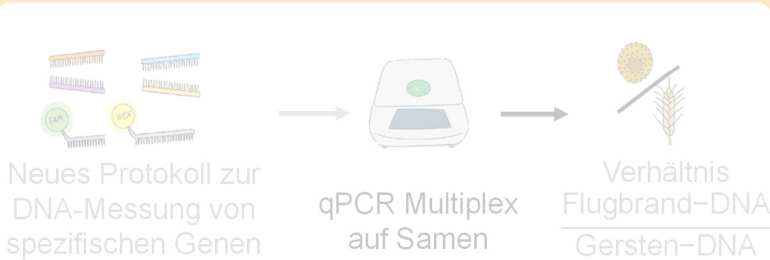
- Zeitsparend
- Anwendung in grossem Masstab

🇨🇭 Prozess der Methodenentwicklung

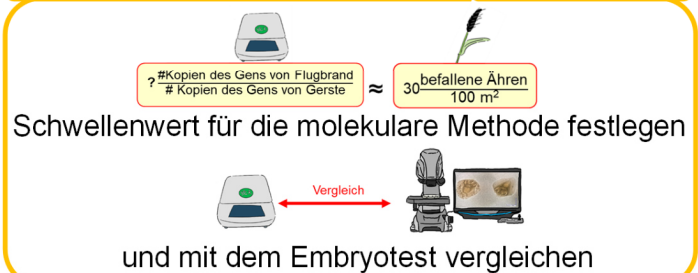
Eine repräsentative Stichprobe erhalten



Optimierung der molekularen Methoden



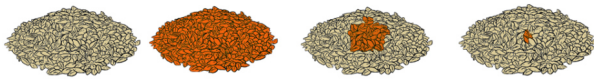
Nächste Schritte





Festlegung der Akzeptanzschwelle für die molekulare Methode

«Gesunder» Posten «Befallener» Posten 10% «Befall.» + 90% «Gesund.» 1% «Befall.» + 99% «Gesund.»

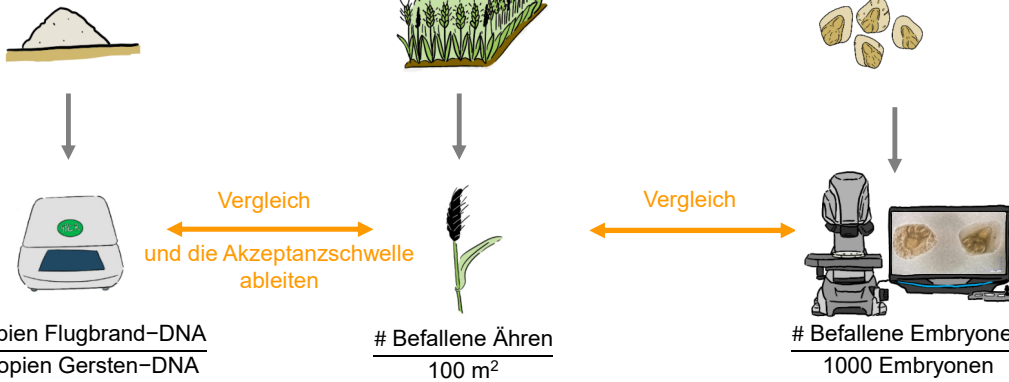


3 Sorten getestet



Ziele der Untersuchung:

1. Feststellen, welche Methode die Infektion im Feld am besten widerspiegelt
2. Ableitung der Akzeptanzschwelle für die molekulare Methode



Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti



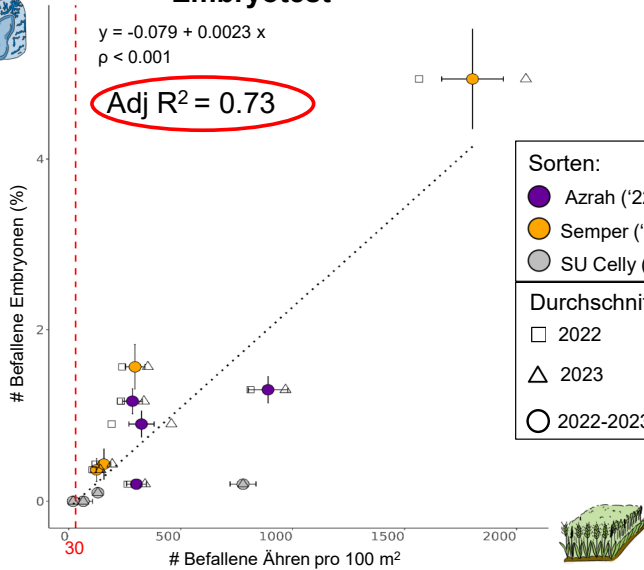
Vergleich mit der Infektion im Feld

Embryotest

$$y = -0.079 + 0.0023x$$

$$p < 0.001$$

Adj R² = 0.73

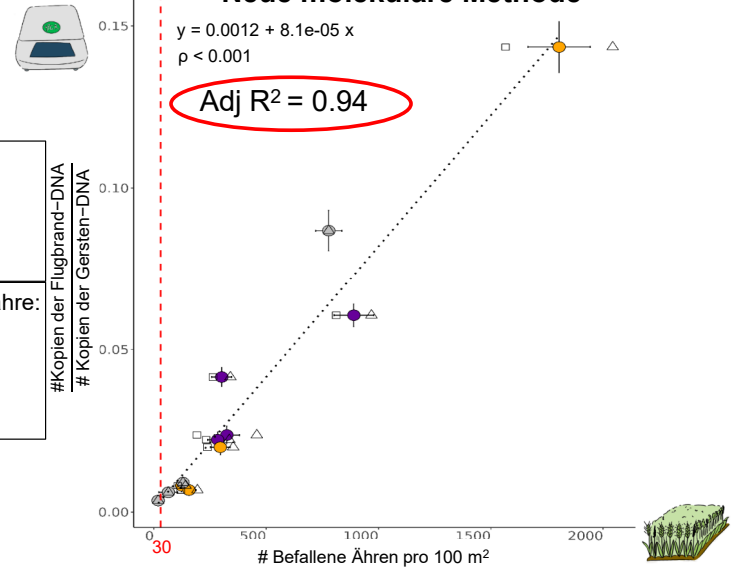


Neue molekulare Methode

$$y = 0.0012 + 8.1e-05x$$

$$p < 0.001$$

Adj R² = 0.94



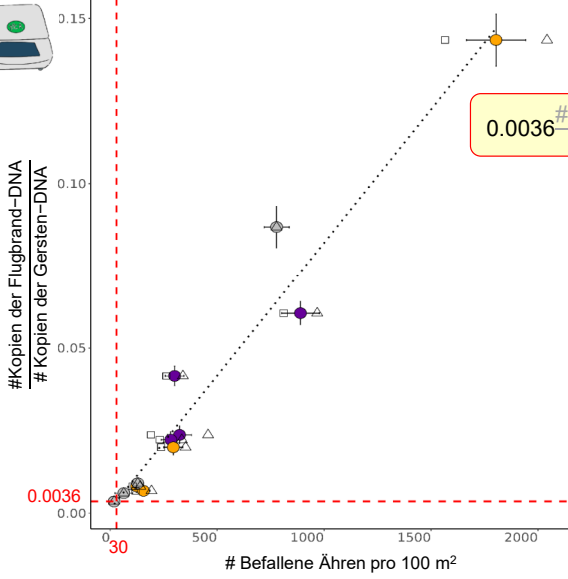
Die molekulare Methode korreliert stärker mit den Ergebnissen im Feld als der Embryotest

Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

Fehlerbalken = Standardfehler



Ableitung der Akzeptanzschwelle für die mol. Methode



$$0.0036 \frac{\text{\#Kopien des Gens von Flugbrand}}{\text{\# Kopien des Gens von Gerste}} \approx$$

$$\approx 30 \frac{\text{\# Befallene Ähren}^*}{100 \text{ m}^2} \approx$$

$$\approx 1 \frac{\text{\# Befallener Embryonen}}{1000 \text{ Embryonen}}$$

- Sorten:
- Azrah
 - Semper
 - SU Celly

Ist der Embryotest oder die neue molekulare Methode für den Nachweis von *U. nuda* in zertifiziertem Saatgut genauer?



Agroscope

Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

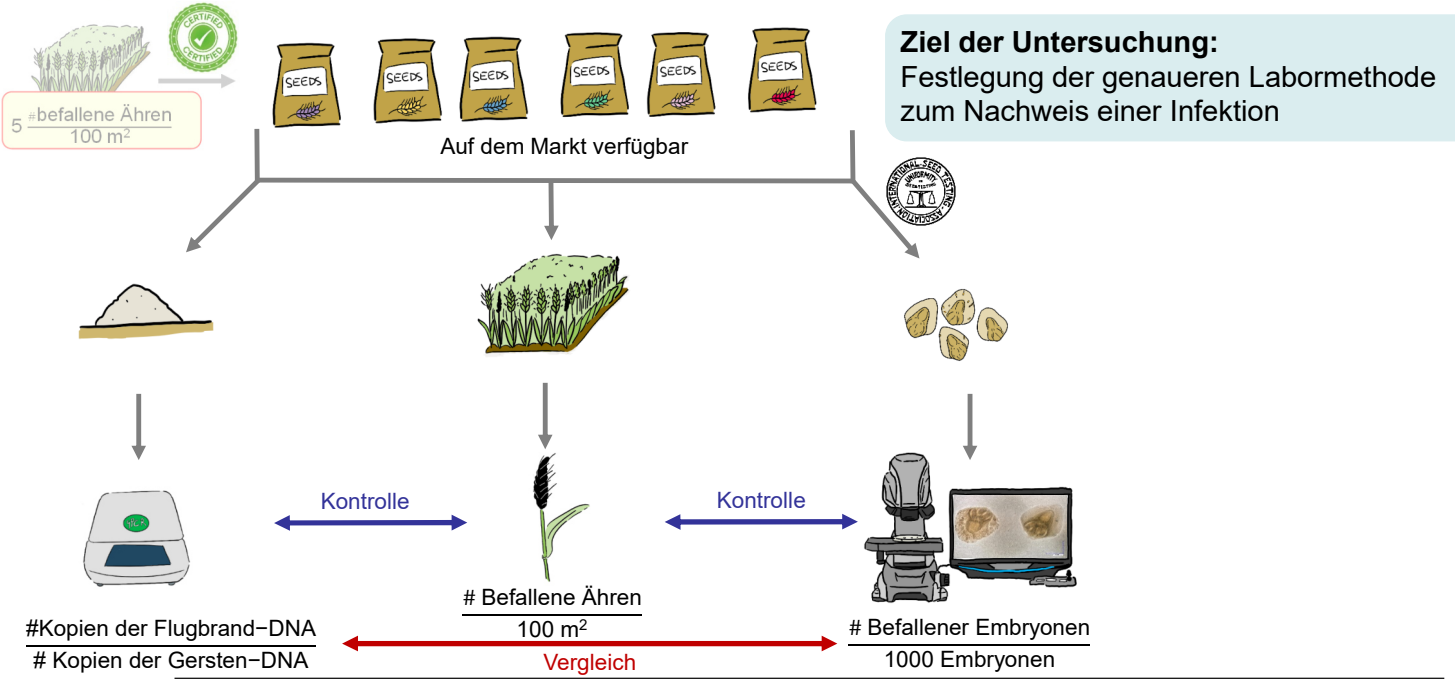
Fehlerbalken = Standardfehler¹¹
* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$

Slide 11

PCA [2]27 Metti in chiaro la soglia derivata come obiettivo
Panzetti Cecilia AGROSCOPE; 09.01.2024



Vergleich der Nachweismethoden



Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

12

Diese 6 Posten wurden für ein zweites Jahr ausgesät. Die Ergebnisse werden im Mai 2024 verfügbar sein



Festlegung der genaueren Labormethode



Befallene Ähren
100 m²



Flugbrand-DNA
Gersten-DNA



Befallene Embryonen
1000 Embryonen

	Posten A	Posten B	Posten C	Posten D	Posten E	Posten F
# Befallene Ähren 100 m ²	2.6 ± 2.58	13.0 ± 1.53	12.9 ± 4.46	0.0 ± 0.00	148.1 ± 25.14	34.6 ± 15.16
# Flugbrand-DNA # Gersten-DNA	0.00032 ± 0.000032	0.00033 ± 0.000025	0.00076 ± 0.000073	0.00041 ± 0.000046	0.056 ± 0.0080	0.0057 ± 0.00045
# Befallene Embryonen 1000 Embryonen	0	1	0	1	0	0

Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

13

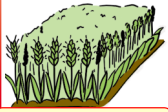
* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$



Festlegung der genaueren Labormethode

Akzeptanzschwelle

- ✗ Über dem Schwellenwert
- ✓ Unter dem Schwellenwert



30 # Befallene Ähren
100 m²



0.0036 #Flugbrand-DNA
Gersten-DNA



1 # Befallene Embryonen
1000 Embryonen

	Posten A	Posten B	Posten C	Posten D	Posten E	Posten F
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗
	0	1	0	1	0	0
	✓	✗	✓	✗	✓	✓

* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$



Festlegung der genaueren Labormethode

Akzeptanzschwelle

- ✗ Über dem Schwellenwert
- ✓ Unter dem Schwellenwert



30 # Befallene Ähren
100 m²



0.0036 #Flugbrand-DNA
Gersten-DNA



1 # Befallener Embryonen
1000 Embryonen

	Posten A	Posten B	Posten C	Posten D	Posten E	Posten F	Entspricht der Referenz
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Referenz
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$

Akzeptanzschwelle

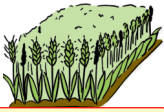
- Über dem Schwellenwert
- Unter dem Schwellenwert



Festlegung der genaueren Labormethode

Zertifizierungsschwellenwert

5 # Befallene Ähren
100 m²



30 # Befallene Ähren
100 m²



0.0036 # Flugbrand-DNA
Gersten-DNA



1 # Befallene Embryonen
1000 Embryonen

	Posten A	Posten B	Posten C	Posten D	Posten E	Posten F	Entspricht der Referenz
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Referenz
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

16

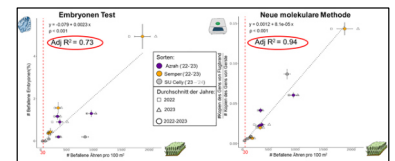
* Aussaatdichte: $\frac{300 \text{ g Saatgut}}{\text{m}^2}$



Schlussfolgerungen

Die molekulare Methode:

- widerspiegelt den Infektionsgrad im Feld gut
- ist genauer als der Embryotest
- könnte zur Überprüfung des Infektionsgrades von zertifiziertem Saatgut angewendet werden



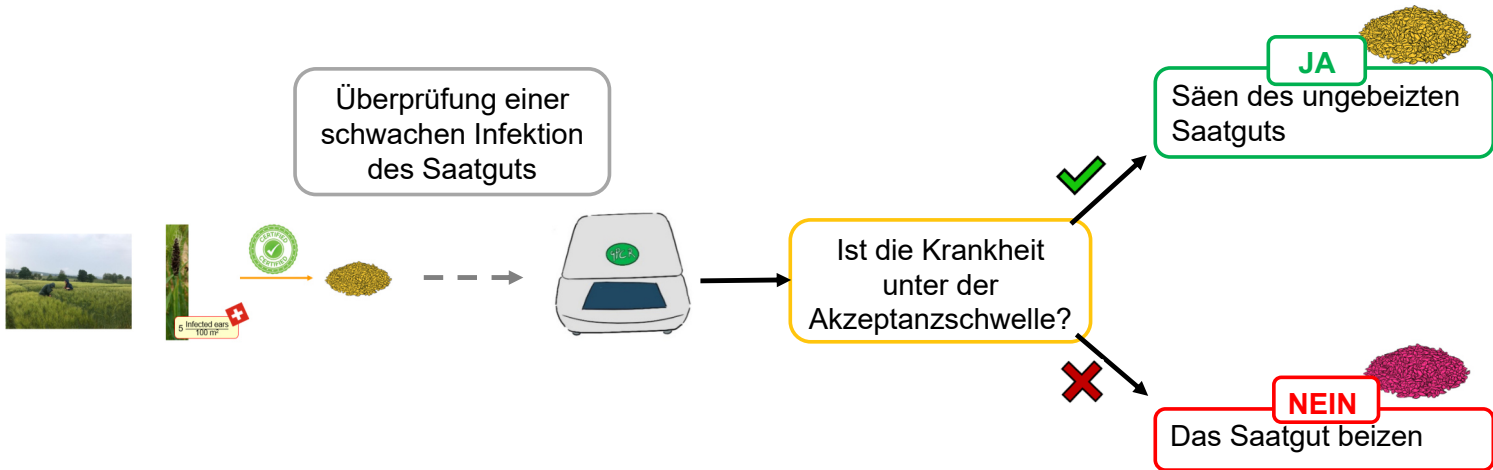
	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Referenz
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Referenz
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot F	Referenz
	2.6	13.0	12.9	0.0	148.1	34.6	Referenz
	± 2.58 ✓	± 1.53 ✓	± 4.46 ✓	± 0.00 ✓	± 25.14 ✗	± 15.16 ✗	
	0.00032	0.00033	0.00076	0.00041	0.056	0.0057	6/6
	± 0.000032 ✓	± 0.000025 ✓	± 0.000073 ✓	± 0.000046 ✓	± 0.0080 ✗	± 0.00045 ✗	
	0	1	0	1	0	0	2/6
	✓	✗	✓	✗	✓	✓	

Pflanzenschutztag Ackerbau | 12.01.2024 | Bienne - Biel
Cecilia Panzetti

17

Ausblick



- Reduktion des prophylaktischen Einsatzes synthetischer Fungizide
- Beitrag zur Realisierung der P.I. 19.475

Verdankungen



Supervisorin von PhD:
Karen Sullam
Molekulare Ökologie



Akademischer Supervisor von PhD:
Daniel Croll
Universität Neuchâtel

Agroscope Forschungsgruppen:



Molekulare Ökologie:
Die ganze Gruppe aber insbesondere:

- Franco Widmer
- Jürg Enkerli
- Tabea Koch
- Florian Gschwend



Saatgutqualität:

- Thomas Hebeisen
- Nicole Bischofberger
- Damian Amrein



Extension Ackerbau:

- Susanne Vogelgsang
- Irene Bänziger
- Eveline Jenny
- Andreas Kägi
- Francesco Bassi
- Magnus Wagner

Externe Forschungsgruppen:



Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL):

- Peter Büttner

Finanzierung:





unine UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL Agroscope

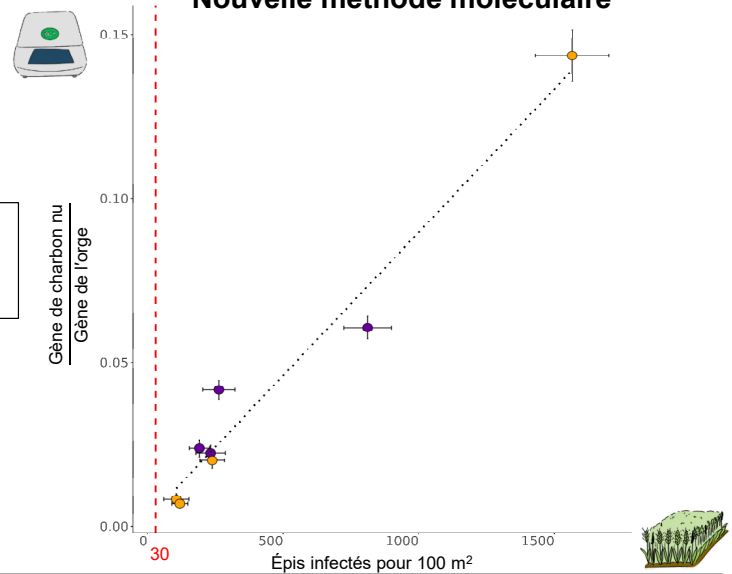
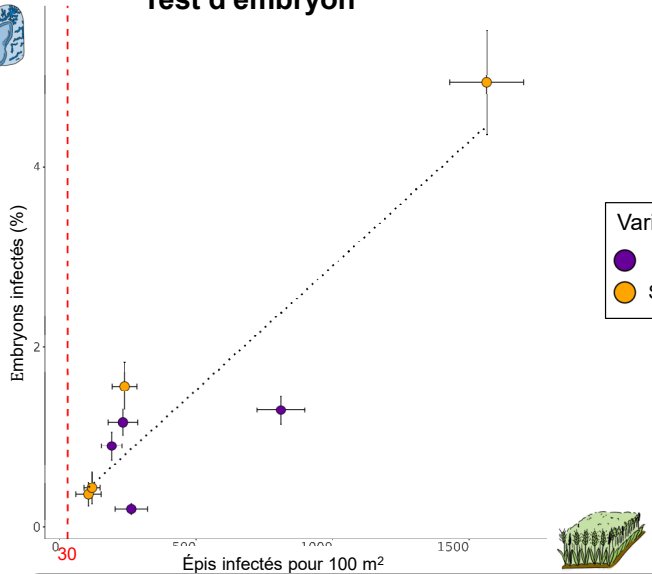
Danke für die Aufmerksamkeit



Corrélation entre les méthodes (2022)

Test d'embryon

Nouvelle méthode moléculaire



Même les lots de semences certifiées étaient au-dessus du seuil de 30 épis infectés par 100 m2.
Nouvelle variété (SU Celly) ajoutée pour 2023



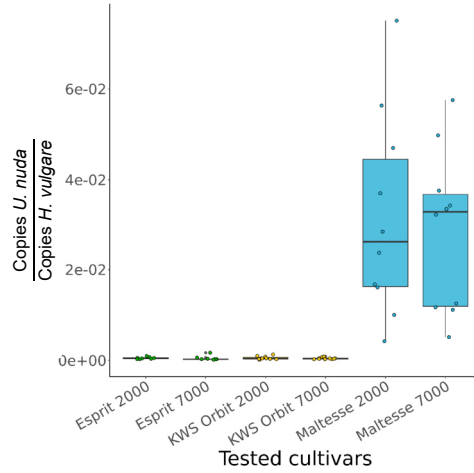
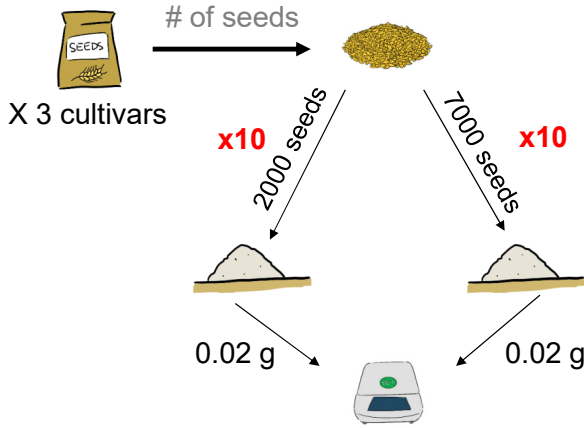
Method establishment process



Develop the qPCR protocol



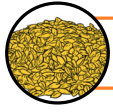
Establish a representative sample



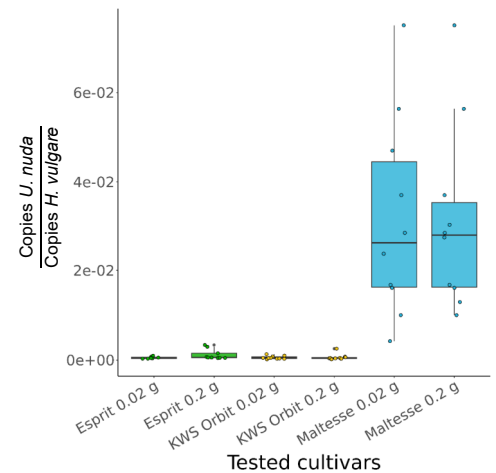
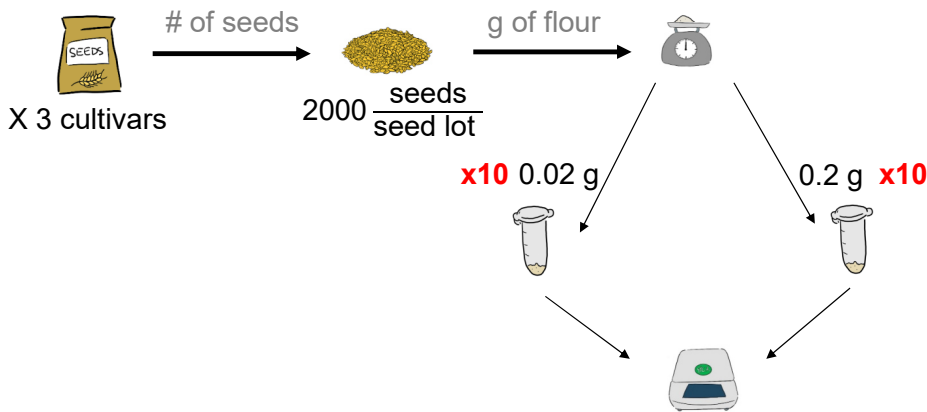
Method establishment process



Develop the qPCR protocol



Establish a representative sample

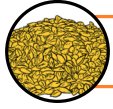




Method establishment process

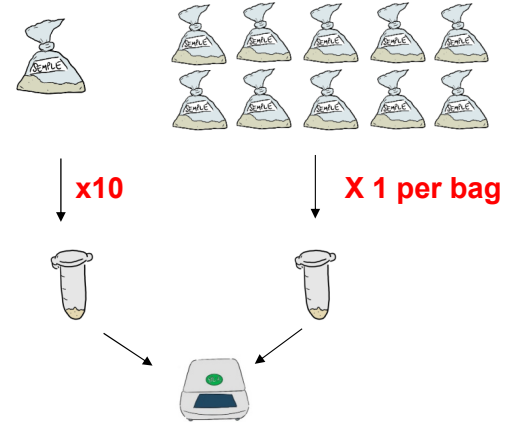
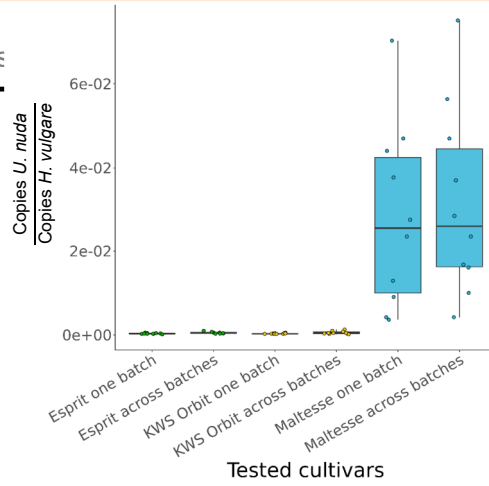


Develop the qPCR protocol

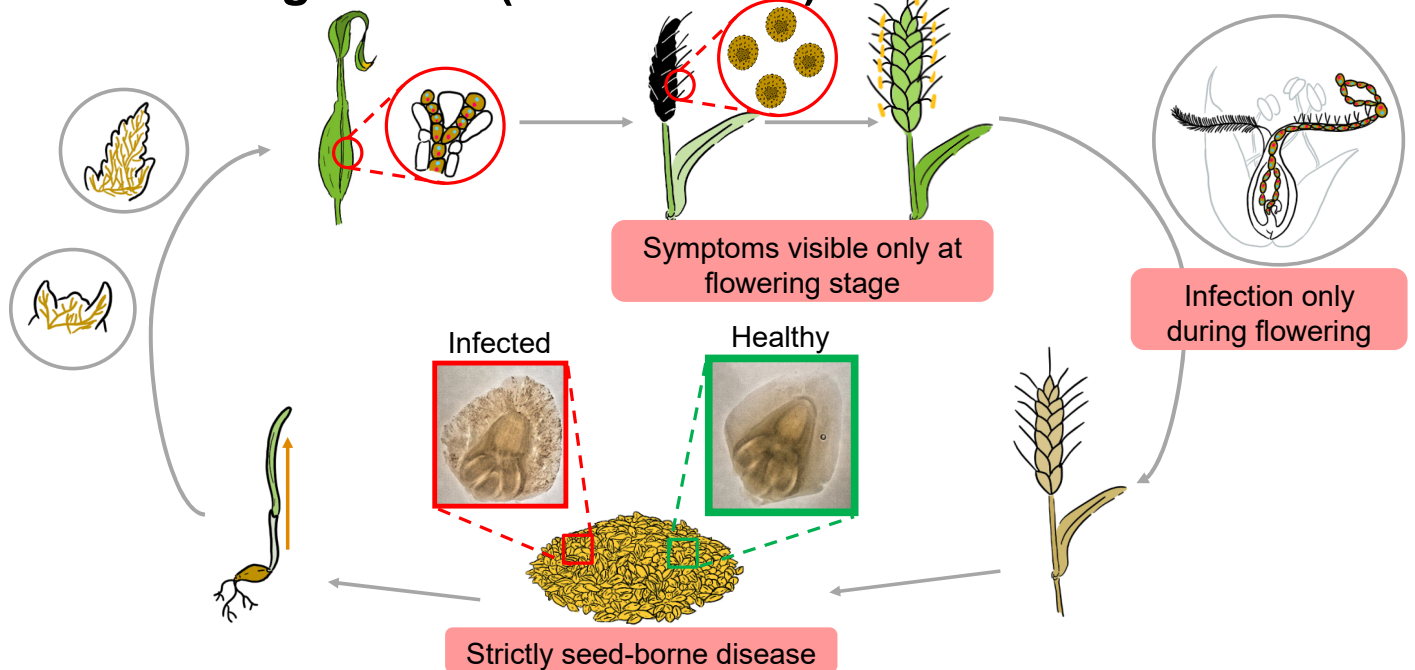


Establish a representative sample

X 3 cultivars



Ustilago nuda (Loose smut)





Compare the detection methods



✗ Over the threshold
✓ Under the threshold



30 Infected ears / 100 m²



1 Infected embryo / 1000 embryos



0.00336 copies *U. nuda* / copies *H. vulgare*

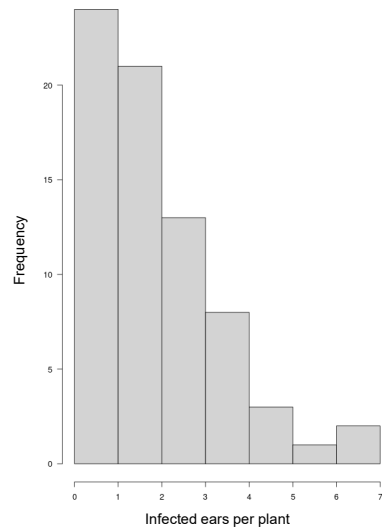
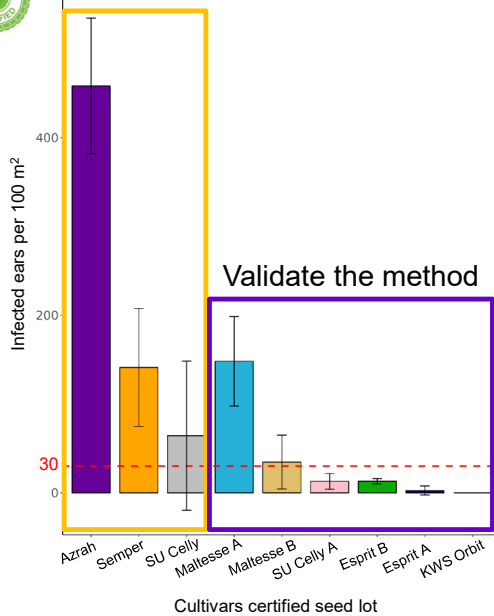
	Esprit A	Esprit B	SU Celly	KWS Orbit	Maltesse A	Maltesse B	Method/field
30 Infected ears / 100 m ²	2.57 ± 5.15 ✓	12.97 ± 3.07 ✓	12.87 ± 8.91 ✓	0 ± 0 ✓	148.12 ± 50.28 ✗	34.63 ± 30.31 ✗	Benchmark
1 Infected embryo / 1000 embryos	0 ✓	1 ✗	0 ✓	1 ✗	0 ✓	0 ✓	Sensitivity = 50% Specificity = 0% Precision = 50%
0.00336 copies <i>U. nuda</i> / copies <i>H. vulgare</i>	0.00032 ± 0.00017 ✓	0.00033 ± 0.00014 ✓	0.00076 ± 0.00040 ✓	0.00041 ± 0.00025 ✓	0.056 ± 0.039 ✗	0.0057 ± 0.0025 ✗	Sensitivity = 100% Specificity = 100% Precision = 100%



Cultivars certified seed lot all available on the market



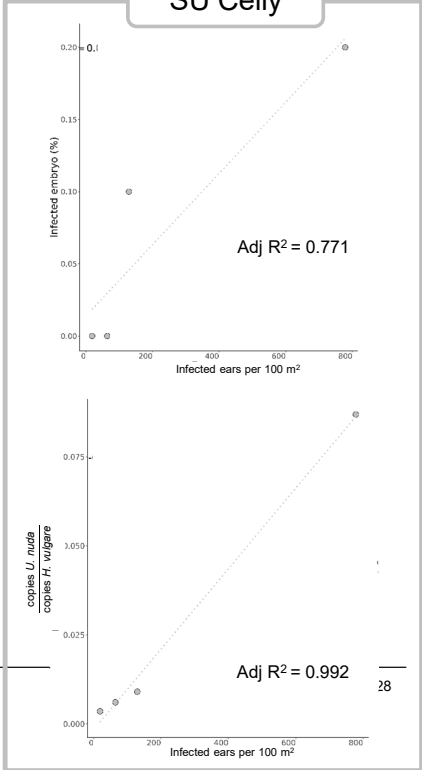
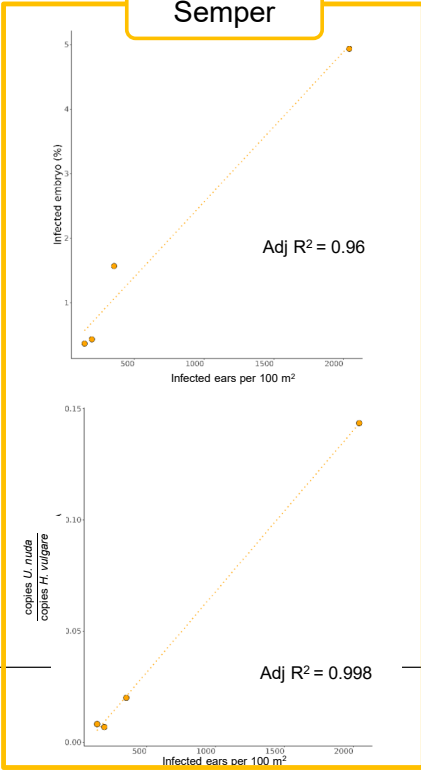
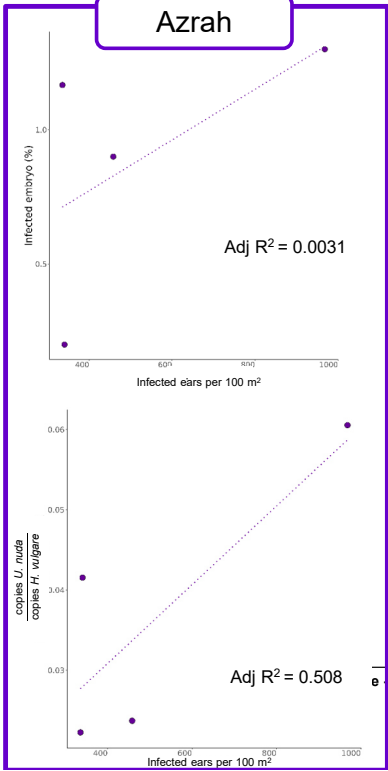
Set threshold





Set threshold correlation in the cultivars

Agroscope



e Biel

28



Why 1 infected embryo/1000 correspond to 30 infected ears/100 m²?

$$\text{Surface cover by seed tested in embryo test} = \frac{\text{Number of seed}}{\text{Sown density used in our trial}} = \frac{1000 \text{ seed}}{300 \frac{\text{seed}}{\text{m}^2}} = 3.33 \text{ m}^2$$

$$\begin{aligned} \text{Minimum number of allowed} \\ \text{infected embryos per 100 m}^2 &= \frac{\text{Field monitoring surface}}{\text{Surface cover by seed tested in embryo test}} * \text{allowed infected embryos} \\ &= \frac{100\text{m}^2}{3.33\text{m}^2} * 1 \text{ infected embryo} = 30 \text{ infeced embryo} \end{aligned}$$

$$\text{Minimum number of infected ears} = 30 \text{ infeced embryo} * 1 \text{ ears/embryo} = 30 \text{ infected ears}$$

$$\text{Maximum number of infected ears} = 30 \text{ infeced embryo} * \text{average barley ears per seed (6)} = 180 \text{ infected ears}$$



Prices and timing

▪ qPCR:

- Cost ~ 100 CHF/sample
- Time 25 samples:
 - 1 day sample preparation (count seed, mill seed, and prepare tubes with flour)
 - 1 day extraction, measure concentration, dilution and qPCR

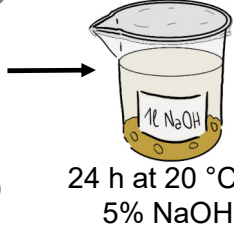
▪ Embryo test:

- Cost ~ 250 CHF/sample
- Time 4 samples:
 - 1 day sample preparation (up to the lab, it is possible to prepare more samples)
 - 1 day extraction and visual inspection (a worker can inspect around 4 samples per day)

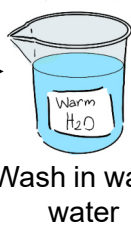


Embryo test procedure

infected embryos ?
1000
2000-4000 seeds
(min # analyze 1000)



24 h at 20 °C in 5% NaOH



Wash in warm water



Endosperm and chaff



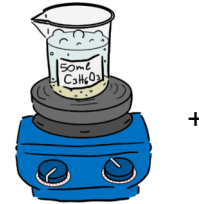
Embryos

Collect the embryos



A mixture of equal quantities of glycerol and water

Further separation of embryos and chaff

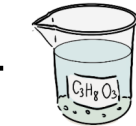


5 min at boil point in lactic acid

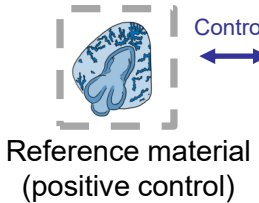


Optional

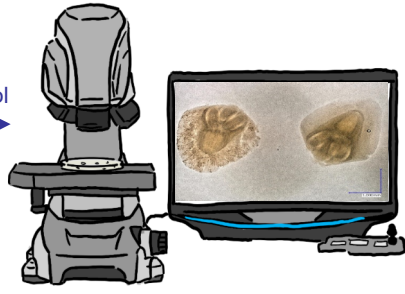
Methyl blue



1-2 h in fresh glycerol



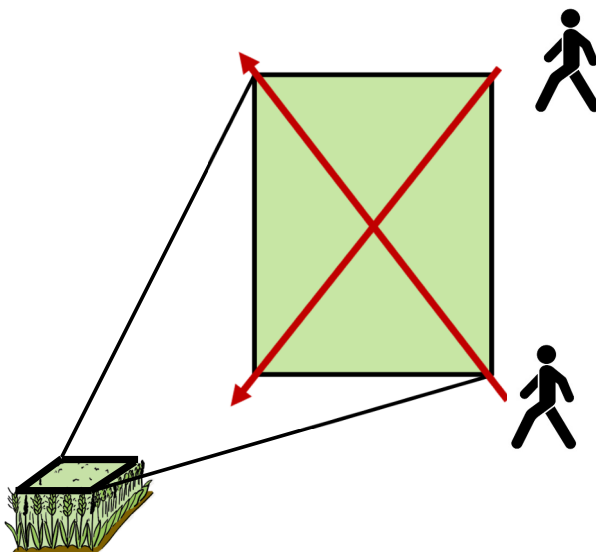
Reference material (positive control)



Examine embryo at x16-x25



Field monitoring for certification



#

=

Field area



Primer specificity (tested in silico)

Barley primers
And probe



H. Vulgare subsp vulgare



H. Vulgare subsp spontaneum

U. nuda primers
and probe



U. nuda



U. hordei



U. bromivora



U. tritici



U. avenae



U. maydis

The non-perfect specificity
of the primers are not a
serious problem because
the seed must also be
certified in purity.



H. Vulgare subsp spontaneum



U. bromivora



U. tritici



U. avenae



Ustilago spp.