

Verena Schneider

Abschlussbericht

DAAD – rise worldwide



Clemson University

Sensitivity of Colletotrichum to Fludioxonil

Juli – September 2019

Ich bekam vom DAAD die Möglichkeit, im Rahmen des rise-worldwide Programmes ein neunwöchiges Praktikum an der Clemson-University zu absolvieren. Mitarbeiten durfte ich im Labor von Professor Schnabel, der sich mit Pflanzen-Pathologie beschäftigt.

Ich arbeitete mit dem Pilz Colletotrichum, welcher verschiedenste Pflanzen unter anderem auch im Obstanbau befällt und so jährlich immensen Schaden anrichtet. Bekämpft werden kann der Pilz mit Fungiziden, gegen welche er allerdings auch Resistenzen entwickeln kann.

Bei einem spannenden Projekt rund um dieses Thema erlernte ich viele neue Methoden und konnte Erfahrungen machen, die ich keinesfalls missen möchte.

Ich lebte dabei in der Kleinstadt Clemson in South Carolina. An den Wochenenden hatte ich aber auch die Möglichkeit, die Umgebung und weitere Städte der Ostküste zu erkunden. So erhielt ich nicht nur tolle Einblicke in ein spannendes Forschungsgebiet, sondern auch in ein beeindruckendes Land.

Vorbereitung

Im März erhielt ich die Zusage für mein Praktikum und freute mich erst einmal riesig. Mit meinem Praktikumsleiter Professor Schnabel und dem DAAD wurde dann der genaue Praktikumszeitraum abgeklärt. Ich begann mich dann zuerst um das Visum und die Flüge zu kümmern, da diese bei einer früheren Buchung noch etwas billiger sind. Dabei entschied ich mich für eine Anreise über Atlanta zum Greenville-Spartanburg-Airport, wo mich Professor Schnabel bei meiner Ankunft dann netterweise abholte. Dabei wählte ich mein Flugdatum so, dass ich bereits am Wochenende vor Praktikumsbeginn ankam. So konnte ich mich noch etwas einleben, zurechtzufinden und den Jetlag überwinden.

Bezüglich des Visums gab es dann einiges zu tun. Benötigt wird für ein Praktikum in den USA ein J1 Visum. Bevor der Prozess in Gang kam, kümmerte ich mich um einen neuen Reisepass. Um das Visum dann zu beantragen ist ein zusätzliches Formular (DS 2019) nötig, welches nur von amerikanischen Institutionen ausgestellt werden kann. Mein betreuender Professor hat sich um dies gekümmert, woraufhin ich auch das nächste Formular, das DS 160 Formular ausfüllen konnte. Nun wurden sämtliche Visumgebühren bezahlt und schließlich konnte ich einen Konsulatstermin vereinbaren. Mein Visum bekam ich dann zum Glück problemlos. Da sich der ganze Prozess über einige Wochen erstreckt empfiehlt es sich, rechtzeitig anzufangen um am Ende nicht in Stress zu geraten. Das Visum ist nämlich zum Beispiel auch zum Abschließen meines amerikanischen Mietvertrages nötig gewesen.

Die Wohnungssuche war parallel mein nächster Schritt und bereitete mir im Voraus das größte Kopfzerbrechen. Nach ein paar Tipps von Prof. Schnabel und vielen Anfragen ergab sich über ein Portal dann zum Glück ein Zimmer zum Untermieten im University Village. Die Anlage war etwas außerhalb der Stadt, hatte aber glücklicherweise eine direkte Anbindung an die kostenlose Buslinie in Clemson. Das war ohne Auto auch absolut erforderlich um zum Campus oder zum Einkaufen zu gelangen, da in einem großen Land wie Amerika doch alles relativ weit voneinander entfernt liegt.

Es empfiehlt sich zudem, sich im Voraus um eine Kreditkarte zu kümmern. Dies ist das gängigste Zahlungsmittel in den USA. Jedoch ist auch etwas Bargeld in der entsprechenden Währung hilfreich, um welches man sich am Besten im Voraus noch kümmert.

Da man über das DAAD bereits ausreichend versichert ist, muss man sich diesbezüglich keine Sorgen mehr machen. Nach meiner Ankunft musste ich meinen Versicherungsschutz, eine amerikanische Adresse und das Einreiseformular nochmals beim Internationalen Büro der Universität nachweisen, um einen gültigen Visum-Status und eine Studentencard zu erhalten. Dann konnte ich mein neunwöchiges Praktikum problemlos starten.

Praktikum

Das Labor von Professor Schnabel, in dem ich mitarbeiten durfte, forscht vor allem an Pilzkrankungen im Pfirsich- und Erdbeeranbau. Diese sind jährlich die Ursache für immense Ernteeinbußen weltweit und deren Kontrolle und Bekämpfung ist daher von enormer Bedeutung.

Die Pathogene werden zunächst identifiziert und charakterisiert, damit sie einer konkreten Spezies zugeordnet werden können. Nun wird die Wirkung verschiedener Fungizide in-vitro (im Labor) und in-vivo (am der Pflanze) zur Bekämpfung der Pilze ermittelt. Es können sich allerdings auch Resistenzen im Pilz gegen die verwendeten Fungizide entwickeln, wodurch diese unwirksam werden. Auf molekularer Ebene werden die entstandenen Resistenzmechanismen erforscht und die Resistenzen im Anbau überwacht.

In diesem großen Forschungsgebiet befasste ich mich mit dem Pilz *Colletotrichum*. Dieser ruft unter anderem in Erdbeeren Fruchtfäule hervor, befällt aber ebenso den Rest der Pflanze. In unseren Experimenten fokussierten wir uns auf das Fungizid Fludioxonil, seine Wirkung gegen den Pilz und die Erforschung auftretender Resistenzen.

Es gibt allerdings noch zahlreiche verschiedene Spezies innerhalb der Spezies *Colletotrichum*, welche unterschiedliche Sensitivitäten und ein unterschiedliches Resistenzrisiko aufweisen. Es war also zunächst erforderlich, unsere *Colletotrichum*-Proben zu identifizieren und einer konkreten Spezies zuzuordnen. Wir extrahierten dafür deren DNA und amplifizierten mehrere Gene per PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion). Zur Kontrolle, ob die PCR auch wirklich funktioniert hat und das gewünschte Gen in hoher Kopien Zahl vorliegt, führten wir stets noch eine Gelelektrophorese durch. So konnten wir die DNA sichtbar machen und bei nicht vorhandener DNA die PCR noch einmal mit veränderten Bedingungen wiederholen. Dann wurden die Genregionen sequenziert und die Sequenzen verglichen. Durch Unterschiede in der Gensequenz konnten die Proben einer konkreten *Colletotrichum*-Spezies zugeordnet werden.

Als nächsten Schritt untersuchten wir die Sensitivität von *Colletotrichum* gegenüber dem Fungizid Fludioxonil. Dabei sollten auch eventuell auftretende Resistenzen erkannt und Unterschiede in der Sensitivität zwischen verschiedenen Spezies beobachtet werden. Die Pilze wurden zunächst in Petrischalen auf Nährmedium gezüchtet. Wir transferierten dann Stücke des Pilzmyzels auf Nährmedium, welches wir mit verschiedenen Konzentrationen des Fungizides versetzten. Anhand des Wachstums auf dem mit Fungizid versetztem Medium ließen sich dann Aussagen über die Sensitivität des Pilzes zu Fludioxonil treffen. Bei einer immer noch hohen Wachstumsrate wurde der Pilz als resistent eingestuft, bei entsprechender Wachstumshemmung als sensitiv. Das selbe Experiment führten wir zudem mit anderen Fungiziden durch, um Vergleichswerte zu erlangen und auch Aussagen über evtl. auftretende Kreuz-Resistenzen treffen zu können.

Um dies auch an den Erdbeerpflanzen in-vivo nachweisen zu können, waren weitere Versuche nötig. Wir testeten die Effizienz des Fungizides hierbei an den Blättern von Erdbeerpflanzen. Diese wurden zunächst nach einer Oberflächensterilisierung, mit dem Fungizid besprüht und dann von uns mit Pilzsporen inokuliert. Nach einigen Tagen konnte beobachtet werden, ob die Blätter vom Pilz befallen wurden und erkrankten, oder ob das Fungizid wirksam war und die Blätter gesund blieben.

Wir beobachteten bei diesen Experimenten, dass eine *Colletotrichum* Spezies zumindest in-vitro eine verringerte Sensitivität gegenüber Fludioxonil aufweist. Daher versuchten wir, den Resistenzmechanismus zu klären. Eine erste Möglichkeit wäre, dass das Zielprotein, welches von Fludioxonil blockiert wird, mutiert ist. So könnte Fludioxonil nicht mehr andocken und wäre wirkungslos. Um eine solche Mutation zu erkennen führten wir eine PCR des Gens für das Zielprotein durch, ließen unser Genprodukt sequenzieren und analysierten die Sequenz. Da das Zielprotein zudem

in osmoregulatorischen Signalwegen eingebunden ist vermuteten wir auch ein vermindertes Wachstum unserer Proben unter osmotischem Stress. Daher versetzten wir Medium mit verschiedenen Salz- und Zuckerkonzentrationen und beobachteten das Myzel Wachstum. Entgegen unserer Erwartungen konnte allerdings kein stark vermindertes Wachstum festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit für eine Resistenz wäre daher das Auspumpen von Fludioxonil durch Efflux-Transporter. Solche Transporter sind auch an Multiresistenzen beteiligt, weshalb wir die Resistenz unseres Pilzes gegen viele weitere Chemikalien und Fungizide untersuchen wollten. Hierfür setzten wir Flüssigkulturen mit unserem Pilz und verschiedenen Chemikalien in verschiedenen Konzentrationen an. Dann wollten wir die optische Dichte messen und daraus die Wachstumsrate unseres Pilzes ablesen. Kann der Pilz bei verschiedensten Chemikalien wachsen, wurde er als Multiresistent eingestuft und die erhöhte Aktivität von Efflux-Transportern war sehr wahrscheinlich. Da wir dieses Experiment neu entwickelten erhielten wir zunächst keine sonderlich guten Experimente und mussten noch einiges optimieren. Letztendlich konnten wir jedoch auch diesen Resistenzmechanismus nicht bestätigen.

All diese Versuche führte ich zusammen mit einer chinesischen Masterstudentin durch, die während ihrer Abschlussarbeit über den gleichen Zeitraum wie ich ein Praktikum im Schnabel-Lab machte, wobei wir viel Spaß zusammen hatten und uns zu einem guten Team entwickelten. Unsere Versuche begleitet hat Dr. Hideo Ishii, welcher uns nicht nur tiefer in die Thematik einführte und einarbeitete, sondern uns auch stets geduldig und hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand. Dieser wird unser Projekt nun auch zu Ende führen und alle offen gebliebenen Fragen hoffentlich aufklären, so dass am Ende evtl. ein Paper veröffentlicht werden kann.

Auch Prof. Schnabel hatte jederzeit ein offenes Ohr für uns, diskutierte unsere Versuche und Ergebnisse und führte uns weiter voran. So kam ich im Nuh problemlos in einem neuen Labor in einem neuen spannenden Forschungsgebiet zurecht und erlernte viele neue Methoden, Kenntnisse und Fähigkeiten. Alle anderen Kollegen waren auch unglaublich nett und so fiel es nicht schwer, sich zu integrieren und einfach eine tolle Zeit zu haben. Ein großes Dankeschön an das gesamte Schnabel-Lab!

Freizeit

Zwischen der Forschung und dem Laboralltag versuchte ich auch, meine Wochenenden zu nutzen und etwas mehr von Amerika zu sehen. Die Kleinstadt Clemson und der Uni-Campus waren zwar sehr idyllisch und ich fühlte mich sehr wohl, jedoch interessierten mich auch die anderen Gegenden der Ostküste. Glücklicherweise ist Clemson an das Amtrak-Netz angeschlossen, die Fernzüge in Amerika. So machte ich tolle Ausflüge in die inoffizielle Hauptstadt des Südens – Atlanta, die Landeshauptstadt Washington und beim Rückflug legte ich noch einen Zwischenstopp in New York ein. In drei völlig verschiedenen Städten in ganz verschiedenen Regionen des Landes lernte ich man Amerika noch einmal von einer ganz anderen Seite und in seiner ganzen Vielfalt kennen. Aber auch ein Trip in die Natur zum Wandern in den National Parks in South Carolina mit schönen Wasserfällen oder dem Lake Hartwell lohnen sich. Ein absolutes Muss war für mich zudem ein College-Football-Spiel, wenn die ganze Stadt plötzlich Kopf steht und ein 85.000-Personen-Stadion mit Orange gefüllt wird. Go Tigers!

Mit netten Kollegen und spannenden Projekten in einem tollen Land gingen meine neun Wochen vorbei wie im Flug und der Abschied fiel mir sehr schwer. Ich machte eine unfassbar tolle Erfahrung, wuchs an meinen Aufgaben, konnte mich weiterentwickeln und so viel lernen, dass ich Professor Schnabel und dem DAAD wirklich unglaublich dankbar bin, dass sie mir dies ermöglicht haben.