

PFLANZENSCHUTZ- BERICHTE

Schriftleitung und Redaktion
Univ.-Doz. Dr. G. Bedlan, Wien
Mag. Astrid Plenk, Wien

Unter Mitarbeit von

Prof. Dr. Carmen Büttner, Berlin
Univ.-Prof. Mag. Dr. Erhard Christian, Wien
Prof. Dr. Heinz-Wilhelm Dehne, Bonn
Dr. Jost Freuler, Nyon
Univ.-Prof. Dr. Erwin Führer, Wien
Dr. Hans-Ulrich Haas, Freiburg
Dr. Martin Hommes, Braunschweig
Dr. Andreas Kahrer, Wien
Dr. Andreas Kofalet, Großbeeren
Prof. Dr. Wolfgang Nentwich, Bern
Univ.-Prof. Dr. Karl Stich, Wien
Prof. Dr. Andreas von Tiedemann, Göttingen
Prof. Dr. Josef-Alexander Verreet, Kiel
Prof. Dr. Volker Zinkernagel, Freising-Weihenstephan

BAND 60/ HEFT 1
2002



Inhalt

Contents

Ein Leitfaden zum Nachweis ausgewählter Pflanzenviren in Forstsaatgut	A guideline for the detection of selected plant viruses in forest tree seeds *)	CARMEN BÜTTNER, MARTINA BANDTE	1
Einfluss des Befalls mit <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> auf Saatgutertrag und -qualität bei <i>Cyclamen persicum</i> MILL. *)	Influence of plant infection with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i> on seed set and seed quality of <i>Cyclamen persicum</i> MILL.	ALOMA EWALD, ANNA ORLICZ- LUTHARDT	15
<i>Colletotrichum</i> cf. <i>gloeosporioides</i> an Johanniskraut (<i>Hypericum perforatum</i> L.) - Untersuchungen zur Biologie und Epidemiologie *)	<i>Colletotrichum</i> cf. <i>gloeosporioides</i> on St. John's-wort (<i>Hypericum perforatum</i> L.) - biological and epidemiological studies	UTE GÄRBER, REGINA SCHENK	25
Untersuchungen über das Auftreten und die Prognose der Kohldrehherzmücke (<i>Contarinia nasturtii</i> Kieffer) an Brokkoli in der Vorderpfalz" *)	Investigations on the distribution of the swede midge (<i>Contarinia nasturtii</i> Kieffer) in the palatinate and control of the first generation via a temperature model	INGEBORG KOCH, A. GEMMAR	37
Resistenz gegen das Kohlschwarzringfleckenvirus (<i>Turnip mosaic virus</i>) in <i>Brassica oleracea</i> -Primitivformen *)	Resistance to Turnip mosaic virus in <i>Brassica oleracea</i> primitive forms	REINER KRÄMER, FRANK MARTHE, EVELYN KLOCKE, ULRICH RYSCHKA, EBERHARD CLAUSS, GÜNTER SCHUMANN	45
Stressmanagement durch <i>Bacillus subtilis</i> *)	Stress management by <i>Bacillus subtilis</i>	BIRGIT KREBS, BIRGIT HÖDING, HELMUT JUNGE	55
Entwicklung einer praxisgerechten Formulierung und Applikationstechnik von hypovirulenten <i>Cryphonectria parasitica</i> - Stämmen zur biologischen Bekämpfung des Edelkastanienrindekrebses in Österreich *)	Development of a practicable formulation of hypovirulent fungal strains of the chestnut blight fungus <i>Cryphonectria parasitica</i> in Austria	THOMAS RÜHMER, MICHAEL STELZL	61

*) Originalsprache

ISSN 0031-675X

Abonnements laufen ganzjährig und verlängern sich automatisch, wenn nicht 1 Monat vor Jahresende die eingeschriebene Kündigung erfolgt.

Schriftleitung und Redaktion: Univ.-Doz. Dr. Gerhard Bedlan und Mag. Astrid Plenk, BFL, Institut für Phytomedizin, A 1226 Wien, Spargelfeldstraße 191.

Verleger und Abonnentenbetreuung: w.o.

Erscheinungsweise: 2mal jährlich - Bezugspreis € 35,61.- (ATS 490.-) p.a.

Hersteller: Repa Copy DC Wien, A 1230 Wien, Triester Straße 122

EINLEITUNG

Alle zwei Jahre wird in Wien ein Symposium über Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau abgehalten. Das 3. derartige Symposium fand vom 17. bis 20. September 2001 statt. Das Symposium umfasste folgende Arbeitsbereiche: Schädlinge, Nützlinge, Krankheitserreger, abiotische Schadfaktoren und Unkräuter im Zierpflanzenbau, Gemüsebau, Weinbau, Obstbau, Öffentlichen Grün sowie im Gewürz- und Arzneipflanzenbau.

Das Symposium wurde vom Institut für Obst- und Gartenbau der Universität für Bodenkultur in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft (Institut für Phytomedizin) und der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft organisiert.

Beim Symposium wurden 56 wissenschaftliche Vorträge gehalten und 45 Poster präsentiert.

Einige diesen Beiträgen zugrunde liegenden Arbeiten werden nun in diesem Heft der PFLANZENSCHUTZBERICHTE und im folgenden Heft des Bandes 60 vorgestellt.

Gerhard Bedlan
für das Organisationskomitee des
3. Symposiums Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau

Pflanzenschutzberichte
Band 60, Heft 1, 2002
ISSN 0031-675X

A guideline for the detection of selected plant viruses in forest tree seeds

Ein Leitfaden zum Nachweis ausgewählter Pflanzenviren in Forstsaatgut

CARMEN BÜTTNER & MARTINA BANDTE

Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, D-14195 Berlin, Germany

Summary

We report about the transmission of plant viruses in forest tree seeds and give a guideline for the detection of viruses in deciduous forest tree seeds in general and then focus on the detection of widespread infections caused by seedtransmissible pathogen cherry leaf roll virus (CLRV).

Serological methods, dot blot hybridization and as well as a modified immunocapture RT-PCR (IC-RT-PCR) are demonstrated to detect the most described and observed seedtransmissible viruses as there are nepoviruses, ilar- cucumo- and tobamoviruses. Applied methods are valued and discussed.

The application of a conserved primer pair is shown to be suitable for the detection of e.g. CLRV which was easily detectable all over the year in collected seeds collected from a CLRV-infected birch-tree.

Key words: plantviruses, forest tree seeds, diagnosis, test procedures, cherry leaf roll virus

Zusammenfassung

Wir berichten über die Übertragung von Pflanzenviren mit Forstsaatgut und geben einen Leitfaden zum Nachweis der Viren in Samen von Laubgehölzen im allgemeinen und fokussieren dann auf die Diagnose weitverbreiteter Infektionen, die durch das samenübertragbare Kirschenblattrollvirus (cherry leaf roll virus, CLRV) verursacht werden.

Serologische Methoden, dot-blot Hybridisierung und eine modifizierte immuno-capture RT-PCR (IC-RT-PCR) werden vorgestellt, um die am häufigsten beobachteten und beschriebenen samenübertragbaren Viren, die Nepo-, Ilar-, Cucumo- und Tobamoviren nachzuweisen. Die vorgestellten Methoden werden diskutiert und bewertet.

Die Anwendung eines hochkonservierten Primerpaars wird als geeignete Methode beispielsweise zum Nachweis des CLRV gezeigt. Damit lässt sich der Erreger während des ganzen Jahres leicht in Samen einer CLRV-infizierten Birke nachweisen.

Stichwörter: Pflanzenviren, Forstsaatgut, Diagnose, Testverfahren, cherry leaf roll virus

Introduction

Investigations on spread of viruses in selected German forest ecosystems and nurseries of North and West Germany confirm former studies from different countries, as NIENHAUS and CASTELLO (1989) reviewed, that many diverse deciduous trees of any age are virusinfected (FÜHRLING and BÜTTNER, 1997).

From the economic point of view one should be aware that virus diseased plants may increase production costs because of the possibly decreased growth of infected stock plants and that they may damage subsequent field performance. Virus infection alters plants predisposition and these trees become more susceptible to abiotic and biotic stress impact and may even lead to completely degenerating, dieing trees.

Referring to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) there are 32 groups of well-characterized viruses but only about twelve of these have been commonly detected in trees and shrubs (COOPER, 1993) and there are only a few virus groups with a marked preference for woody perennial hosts use pollen and/or seed to an important extent for their dissemination as there are nepoviruses, ilarviruses and cucumoviruses. Seed transmission may be of very considerable economic importance, because viruses may persist in seed for long periods so that commercial distribution of a seedborne virus over long distances may readily occur (BÜTTNER and BANDTE, 2000).

Nepoviruses being transmitted by seed and pollen and by other causes such as nematodes and mechanical means have been frequently detected in trees and shrubs: cherry leaf roll virus (CLRV) is the most common and the most detected virus in many species as there are e.g. *Betula* sp., *Cornus* sp., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus excelsior* L., *Juglans regia* L., *Rhamnus catharticus* L. and *Sambucus nigra* L.. The virus causes chlorotic ring spots and lines, in many cases small leaves and may finally lead to degenerating twigs or trees (BANDTE and BÜTTNER, 2001). Furthermore arabis mosaic virus (AMV) occurs in ash.

Iilarviruses tend to be host specific and be transferred via pollen. They are widespread in fruit trees and cause serious losses. Elm mottle mosaic virus (EMMV) in *Syringa vulgaris* L. and in *Ulmus glabra* L. has been recorded as well as apple mosaic virus (ApMV) in *Rosa* spp. and *Corylus avellana* L. and prunus necrotic ringspot virus (PNRV) in *Aesculus hippocastanum* L.

Cucumoviruses are transmitted in seeds and are very common to be found in cultivated plants. The main member cucumber mosaic virus was detected in *Lonicera periclymenum* L. and *Ligustrum* spp..

Tobamoviruses are known to be transmitted by contaminating the seed coat and infect the seedling when germinating. Tobamoviruses have been detected in *Quercus robur* L. and *Acer* spp. (FÜHRLING and BÜTTNER, 1998).

Most of the virus infected plants cause a serious source for the widespread of the pathogens, because they are easily transmitted by seed and pollen and/or by soil, water or through vectors.

Two general types of seed transmission can be distinguished. Seed transmission may be the result of contamination of the seed coat with virus particles, resulting in subsequent infection of the germinating seedling by mechanical means. The external virus can be inactivated by certain treatment eliminating almost all seed-borne infection.

In the more common type of seed transmission the virus is found within the tissues of the embryo which may become infected through the ovary or via the pollen.

Most seed-transmitted viruses are also transmitted through pollen from infected plants, and all known pollen transmitted viruses are also seed transmissible. The mechanisms transmitting pollen are either within the sperm cell nucleus or cytoplasm or second on the exine of the pollen grains. The germ tubes growing from such pollen may then pick up virus particles and carry active to the ovule.

In case that cure of virus infections is not possible, prevention is an important tool to control plants. Except for eliminating affected and unthrifty trees, it is usually impractical to prevent the spread of viruses between trees in the field after planting into the field. Attention is inevitably focused on the nursery production of planting stock where critical examination and assessment of vigour can be practised routinely.

Prevention tools are possible when the pathogen is detected and its general properties including its mechanisms of natural dispersal are known. Therefore diagnostic trails have to be established (BÜTTNER et al., 1996).

In this paper we will give a guideline and a laboratory manual for diagnostic tools to detect the most common seed- and pollen transmissible viruses affecting woody perennials.

Material and Methods

In regard to the most common virus in forest trees we focus on the nepovirus CLRV which is a seed- and pollen transmissible pathogen to demonstrate a modified PCR-technique to detect the pathogen in leaves and seeds. Furthermore the hybridization technique is applied to detect previously unknown tobamoviruses of diseased oak- and acer trees. The ilarviruses and the cucumoviruses were identified by the serological test ELISA.

When testing seeds, there are two trails to prepare the samples, first the direct preparation of the seeds when possible. And second using leaf tissue after the seeds have germinated. In all cases of the procedures the seed coat has to be removed before starting the sample preparation.

The electronmicroscopy has to be regarded as not reliable and a less suitable tool to detect viruses directly from seeds, because of the irregular distribution of the pathogens in seed lots and the low concentration of the pathogens. In some cases the ELISA overcomes this problem, but still phenolic compounds may disturb clear results. Only the methods based on nucleic acid detection such as hybridization or amplification of characteristic fragments have shown progresses to reach a higher sensitive testing and reliable results.

Double antibody sandwich ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)
(CLARK AND ADAMS, 1977, VAN REGENMORTEL, 1982)

If bacterial contamination is likely to occur, 0,02 % sodium azide may be added to all buffers used in the assay.

10 x PBS (phosphate buffered solution, pH 7,4): NaCl (80 g), KH_2PO_4 (2 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (14,4 g), KCl (2 g) add aqua dest. 1000 ml

Preparation of the antibody

the globulins should be prepared by precipitation from antiserum with an equal volume of 4 M ammonium sulfate



stir solution slowly for an hour at room temperature



centrifuge the solution (8000 rpm for 10 min)



resuspend the pellet in 1ml phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) (half concentration)



remove ammonium sulfate by dialysis using PBS (half concentration)

ELISA-Testing

Step 1: coating (specific antibodies are adsorbed to the plate)

antibodies are diluted in coating buffer (usually 1:1000, but has to be tested before in dependence on the quality of the antibodies)



use 200 μl / well for coating (coating by passive adsorption)



incubate at 37 °C for 4 hrs



wash 3 times with PBS-T

(PBS containing Tween 20 (0,05 %)) Use 3 minutes intervals between washes

Step 2: sample preparation (virus is added)

viral antigens in seeds or leaf material are extracted (1:10 - 1:30 in PBS-T)



transfer 200 μl of the sample into the wells



incubate overnight at 4 °C



wash 3 times with PBS-T, use 3 minutes intervals between washes

to reduce nonspecific reactions and increase the sensitivity of the virus detection polyvinyl pyrrolidone (1-2 %), urea (1 M) or reducing agents (Guggerli, 1979) may be added to the buffer

Step 2 a: blocking (gives in some cases better results)

block with 200 μl 1 % Bovine serum albumin (BSA) per well



incubate for 2 hrs at room temperature
↓
wash 3 times with PBS-T
↓
use 3 minutes intervals between washes

Step 3: conjugate (enzyme labeled specific antibodies are added)
antivirus enzyme conjugate is diluted in PBS-T (usually 1:500-1:1000, but has to be determined empirically)

↓
transfer 200 µl per well
↓
incubate at 37 °C for 4 hrs
↓
wash 3 times with PBS-T, use 3 minutes intervals between washes

the enzyme conjugate most commonly used is prepared with alkaline phosphatase (Boehringer, Mannheim or Sigma, St. Louis, Missouri) by coupling the globulins with enzyme at 1 ml:0,1 ml (v:v, globulin:enzyme) using 0,06 % glutaraldehyde. The conjugate should be stored at 4 °C in the presence of 1 % bovine serum albumin.

Step 4: substrate (enzyme substrate is added)
dilute (just before use !) the substrate *p*-nitrophenyl phosphate (1 mg/ml) in (0,1 M diethanolamine buffer pH 9.8)

↓
transfer 250 µl into each well
↓
results are scored visually by appearance of a yellow colour, or adsorbances at 405 nm are read by spectrophotometer or ELISA-reader

↓
reaction is stopped by the addition of 50 µl of 3 M NaOH to each well

Results are considered positive if the adsorbance is twice that found with healthy controls, or alternatively, if it is two standard deviation units higher than the mean of a negative control curve.

Immunocapture-reverse transcriptase polymerase chain reaction (IC-RT-PCR)
(BÜTTNER et al., 1996; WERNER et al., 1997)

sample preparation

a)

grind plant tissue under liquid nitrogen
↓
homogenize the powder in buffer; 1:10, w.v
(PBS-Tween, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40))

b)

homogenize plant tissue with sterile seasand in buffer; 1:10, w.v
(PBS-Tween, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40))

Coating and reverse transcription

coat sterile reaction tubes (0,5 ml, Eppendorf Safelock) with 50 µl purified CLRV specific antibodies (40 µg/ml in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6)



incubate for 3 hrs at 37 °C



wash the tubes 3 times for 3 minutes with 150 µl PBS-Tween
(20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 135 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20)



incubate the coated tubes with 50 µl of the plant extracts (see sample preparation)
over night at 4 °C



wash 3 times for 3 minutes with 150 µl PBS-Tween



centrifuge the tubes briefly and remove remaining washing buffer



add buffer to a total volume of 20 µl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, containing
75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dNTP's, 20 U ribonuclease inhibitor
(Promega, Madison), 200 U M-MLV reverse transcriptase (GIBCO BRL, Inchinnan),
100 pmol CLRV specific first strand primer (5'-GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG
G-3')



incubate the captured virions for 1 h at 37 °C,



heat denaturation at 95 °C for 3 min



amplify aliquots of 2 µl of the reverse transcription reaction in a subsequent PCR

Polymerase chain reaction

mix:	2 µl	aliquot of the reverse transcription reaction
	20 pmol	first strand primer
	20 pmol	second strand primer
	2,5 U	Taq-DNA-Polymerase

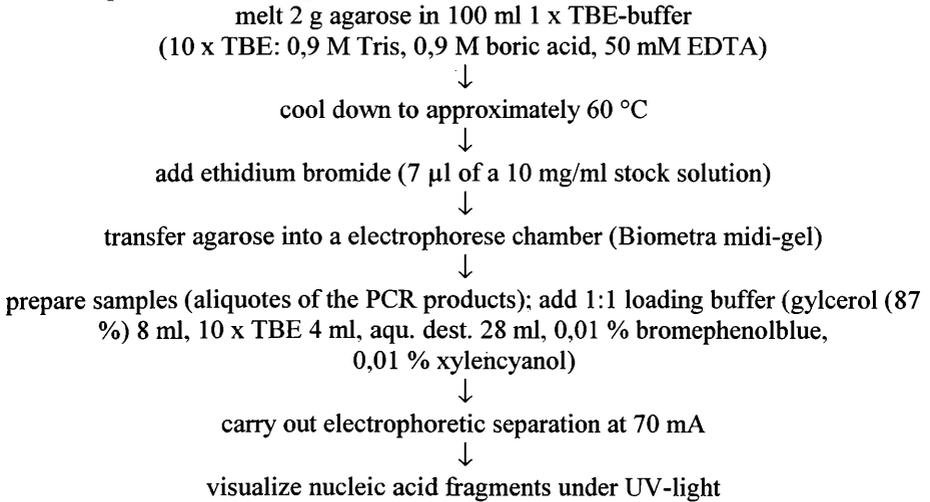


add 100 µl buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, containing 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl)



amplification of the viral cDNA in a thermocycler
35 cycles: primer annealing at 51 °C for 60 s
chain elongation at 72 °C for 60 s
denaturation at 95 °C for 30 s

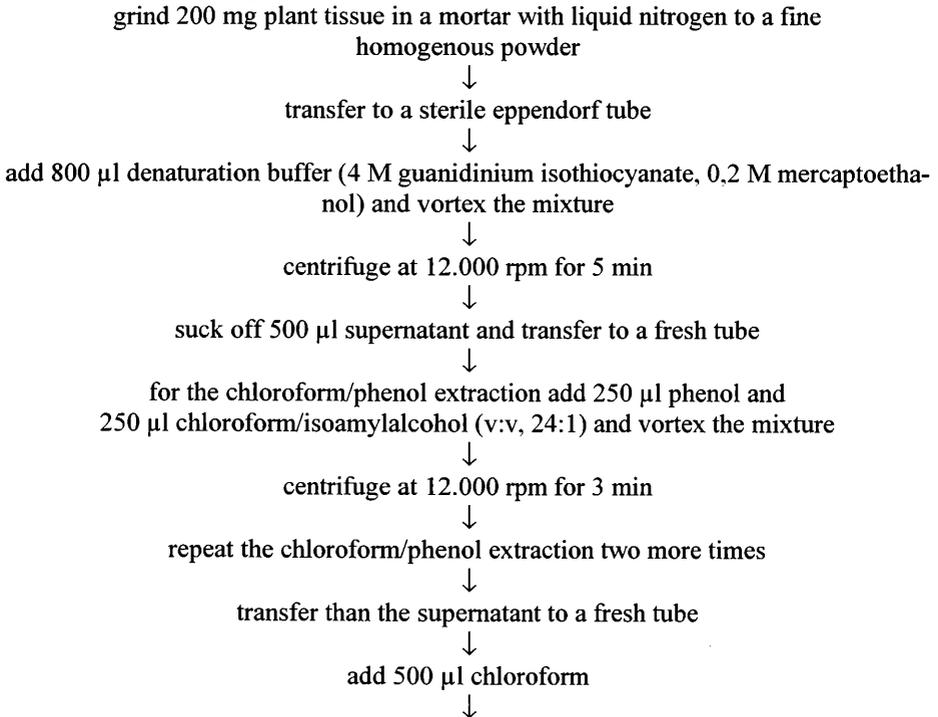
Gelelectrophoresis of the amplification products

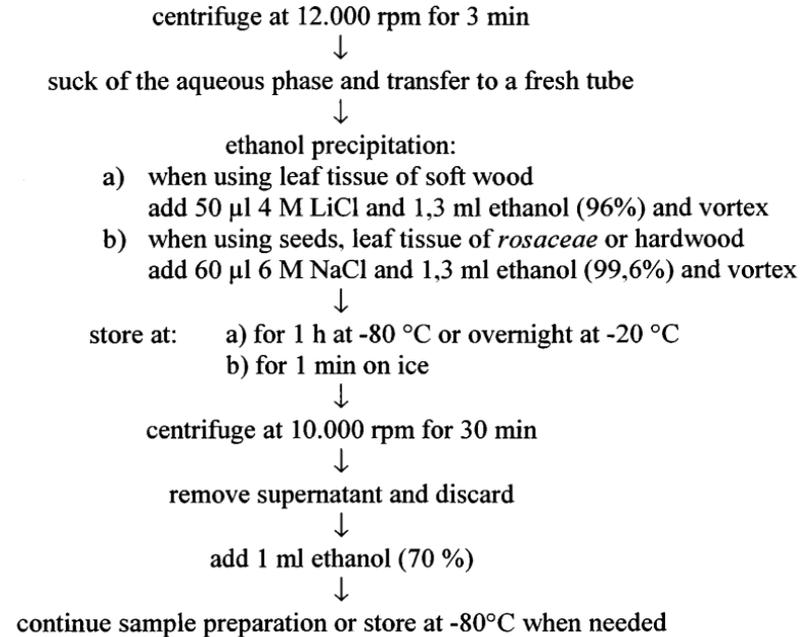


Dot blot hybridization (MILTENBURG ET AL., 1995)

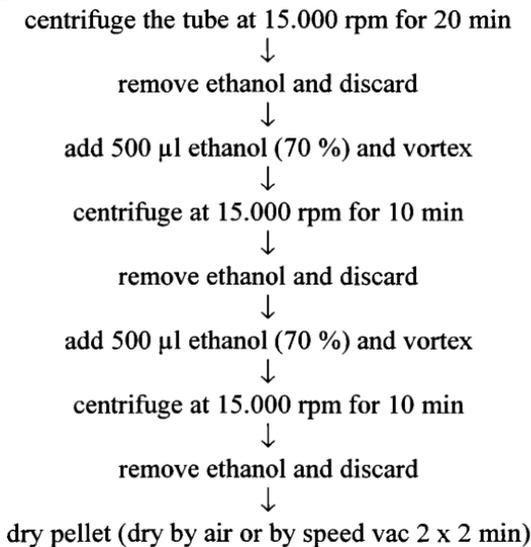
It is necessary to use sterile Eppendorf tubes and DEPC-treated aqua dest. to produce the mentioned buffers.

RNA-extraction from plant tissue

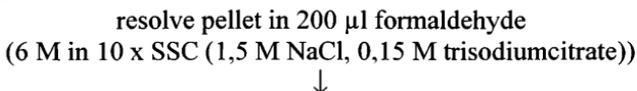


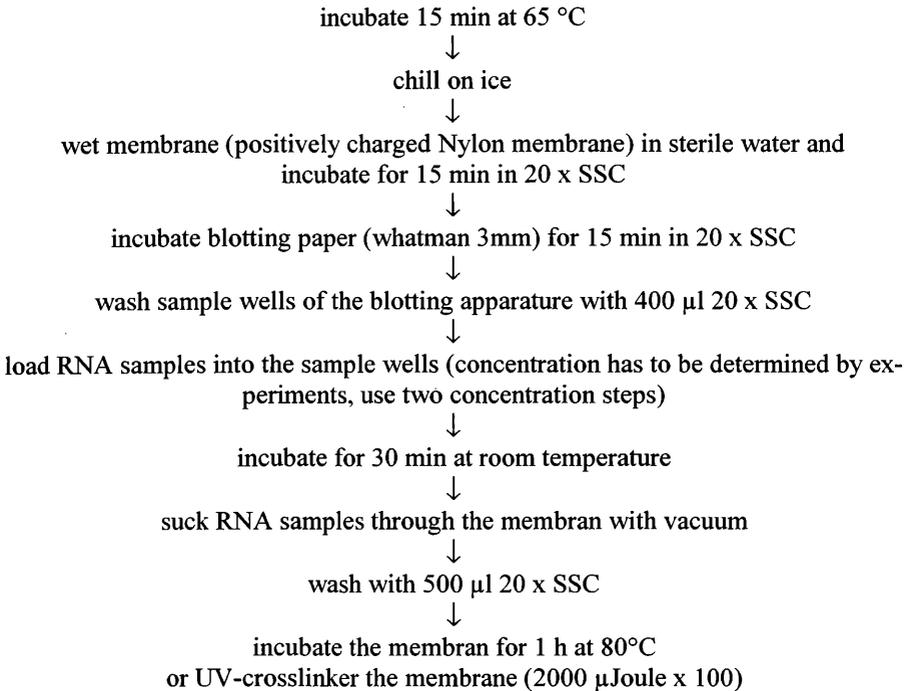


sample preparation

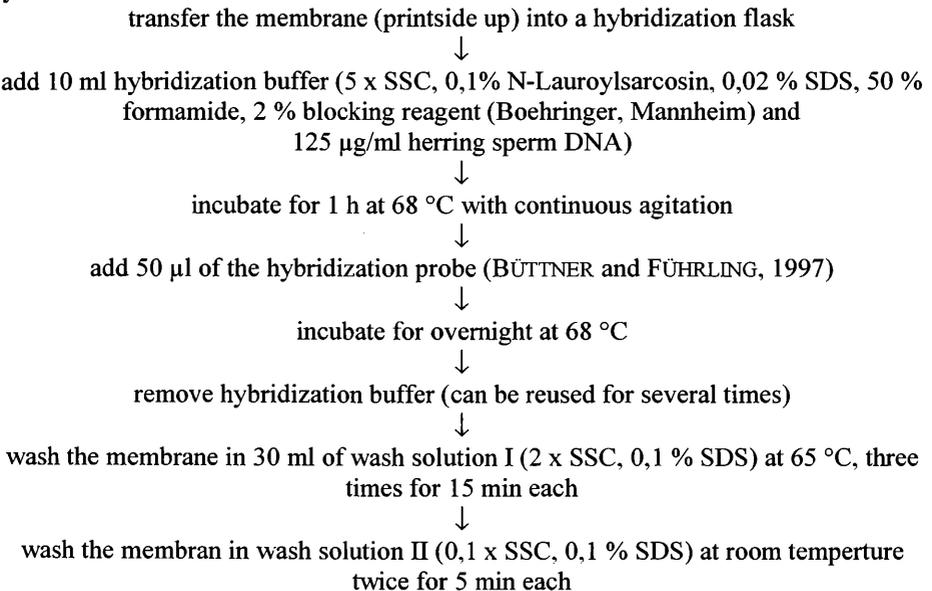


blotting procedure

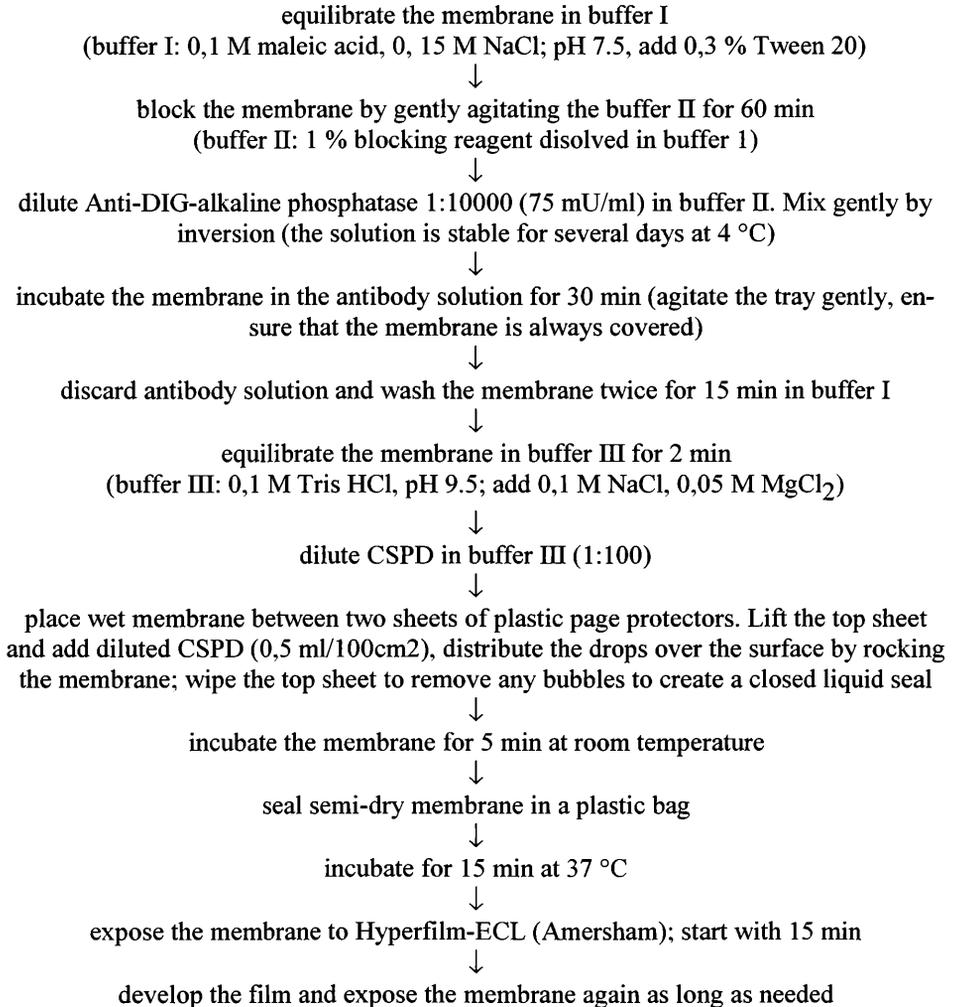




hybridization



detection



Results and Discussion

Viruses of woody forest plants and of their seeds are known to be difficult to detect due to phenolic compounds in plant extracts and an often irregular distribution or the low concentration of the pathogens within the plants and seeds when using serological methods as a tool (BÜTTNER and FÜHRLING, 1996). But still these methods have to be regarded as important diagnostic tools when considering the restricted capacity of the test.

The objectivity of electron microscopy has increased by the use of immunological reagents, but we cannot recommend it as a reliable test searching for viruses in seeds of

woody plants. When using antiserum coated electron microscope grids, virions can be selectively adsorbed from plant extracts by additional precision when decorating the particles with specific antibodies applied to the grids. These methods have been used to locate cherry leaf roll virus on and in pollen from birch or walnut (MASSALSKI and COOPER, 1984; MASSALSKI et al., 1988), but is not suitable for routine testing.

The ELISA is a most sensitive immunological system. COOPER et al. (1986) detected ilarviruses in cherry (*Prunus avium*) seed and poplar mosaic virus in large-scale surveys of poplar germplasm. There are no reports on detecting cucumoviruses in forest tree seeds by ELISA, but studies on seeds from herbaceous hosts confirm that the ELISA is a reliable test.

Methods which detect nucleic acid are often essential when the pathogen being sought lack protein. A new perspective for the diagnosis gives the combination of grafting plants to transmit the pathogen to host plants and a modified technique of the polymerase chain reaction (PCR) as well as the hybridization technique to detect the assumed pathogen (BÜTTNER et al., 1996). The PCR and hybridization technique are sensitive methods to detect viruses of smallest amount. WERNER et al. (1997) evaluated a method for detecting cherry leaf roll virus (CLR V) in seeds of birch and concluded that PCR followed by immunocapture-reverse transcriptase is the most sensitive way to detect the viral RNAs without a radioactive detection, which makes the system cheaper and more reliable for routine use.

CLR V was detected in single birch seeds but not in all seeds from an infected tree, even if they derived from the same female inflorescence. This finding confirms previous observations on the vertical spread of CLR V in cherry trees (LÖW, 1995) and birch, where healthy progeny could be issued from infected trees (COOPER, 1993). We have shown 200 birch seeds from an infected tree to estimate the vertical transmission rate and yielded 16 seedlings. All seedlings were tested for CLR V-infection by IC-RT-PCR. Five of them were strongly infected, one showed a weak signal, and the other 10 seedlings seem to be uninfected (data not shown). A serial dilution of plant sap from leaf buds of a CLR V infected tree was carried out to determine the dilution limit of plant sap for detection of CLR V by IC-RT-PCR. In comparison to ELISA techniques RT-PCR approaches represent a remarkable improvement in sensitivity (WETZEL et al., 1992, NOLASCO et al., 1993). Our results confirm that the RT-PCR assay is 1000-10.000 times more sensitive than the ELISA. The IC-RT-PCR enables the detection of CLR V in samples of very small amount such as in seeds (WERNER et al., 1996). In plant sap dilutions and seeds, stored at 4 °C, CLR V could be detected by IC-RT-PCR within 3-4 weeks.

As shown by COOPER (1993) seed transmission rate of CLR V is very variable and depends on whether male or female gametophytes derive from a CLR V infected tree. The rate of vertical transmission of viruses also depends on host factors, viral strains and environmental conditions (MAULE and WANG, 1996), but the high sensitivity of the IC-RT-PCR provides good means to detect CLR V infections even at low transmission rates in spot-checks of seed material.

The hybridization technique can be applied to detect particular plant RNA viruses or viroids in case that a specific RNA-probe is available. This probe has to be produced by molecularbiological methods. In comparison to the described IC-RT-PCR it is not nec-

essary to have informations concerning the genom sequence to construct a probe. Whereas the selected oligonucleotide primers used in the PCR are synthesized based on the sequence of conserved genom regions. Varying the hybridization conditions (especially temperature) a sequence homology of 60-70% in between the specific RNA probe and the sample RNA is sufficient for the detection. If the reagents for both methods, the IC-RT PCR and the hybridization, are available the hybridization should be applied if the identification of virus strains is not object of the investigation. The dot blot hybridization is particularly qualified for routine diagnostic testing of a large scale samples. The PCR is more specific than the hybridization and enables the differentiation of virus strains. This specificity excludes the application of the method for general virus diagnosis purpose. Furthermore technical equipment and chemicals which are more expensive.

Concluding remarks

By the worldwide shift from extensive to intensive forest management, systems of high quality forest stands have been established. To preserve their value, more resources must be committed to the protection of forest stands. Forest tree pathology plays a major part in conserving the economic value of a forest stand (HUBBES, 1993). Therefore potential and existing disease threats must be identified and prophylactic methods including disinfecting trails for disease control have to be developed (BÜTTNER and Bandte, 2001). In contrast to other pathogens viruses can not be controlled by curative treatments. Therefore prophylactic measures and the planting of virus-free seedlings are the basic requirement to ensure a long-term economic forest stand. For instance, CLRV is widely distributed, and early detection is an important part of the strategy for prevention of the spread of the disease. In regard to CLRV, new stands should be established with CLRV-free seedlings. As this pathogen is seed-transmissible to a high degree, seed lots as well as growing seedlings have to be tested for CLRV infection before planting into their final stand. A new infection in a stand may be introduced by contaminated soil or water, but these transmission modes are epidemiologically of minor importance. Molecular biological techniques may offer the basis for the establishment of a test suitable for routine diagnosis (BÜTTNER et al., 1996). The required method demands high reliability and sensitivity and has to be suitable for seeds as well as leaves and buds in regard to practical approach.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant-no: BU 890/2-3 and Bu 890/6-1.

References

BANDTE, M., BÜTTNER, C.: A review on an important virus of deciduous forest trees - cherry leaf roll virus: occurrence, transmission and diagnosis -. Pflanzenschutzberichte. **59** (2), 1-19, 2001.

- BÜTTNER, C., FÜHRLING, M.: Studies on virus infection of diseased *Quercus robur* (L.) from forest stands in Northern Germany. *Ann. Scien. For.* **53**,383-388, 1996.
- BÜTTNER, C., FÜHRLING, M., WERNER, R., MÜHLBACH, H-P., LUKÁCS, N.: Phytopathogene Viren in Laubbäumen des öffentlichen Grüns und Baumschulen sowie in Böden und Gewässern - eine diagnostische Vorgehensweise. *Gesunde Pflanzen* **48**, 95-103, 1996.
- BÜTTNER, C., BANDTE, M.: Virusübertragung bei Gehölzen durch Saatgut und vegetative Vermehrung. In: *Jahrbuch der Baumpflege 2000*. Eds. D. Dujesiefken und P.Kockerbeck. Thalacker Verlag, 194-199, 2000.
- BÜTTNER, C., BANDTE, M.: Übertragungsmöglichkeiten von Forstvirosen und deren Bekämpfung. In: *Jahrbuch der Baumpflege 2001*. Eds. D. Dujesiefken und P.Kockerbeck. Thalacker Verlag, 230-233, 2001.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483, 1977
- COOPER, J.I.: *Virus diseases of trees and shrubs*. Chapman & Hall, London, 205 p. 1993
- COOPER, J. I., EDWARDS, M. L., SIWECKI, R.: The detection of poplar mosaic virus and its occurrence in a range of clones in England and Poland. *Eur. J. For. Path.* **16**, 116-125, 1986
- FÜHRLING, M., BÜTTNER, C.: Viruserkrankungen an Laubgehölzen - zu beachten in Baumschulen, im Garten- und Landschaftsbau sowie im Forst -. In: *Jahrbuch der Baumpflege 1997*.Ed. D. Dujesiefken und P.Kockerbeck. Thalacker Verlag, 184-188, 1997
- FÜHRLING, M., BÜTTNER, C.: Nachweis von Tobamo-Viren in Bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.) mit Scheckung und Blattdeformation. *Forstw. Cbl.* **117**, 92-97, 1998
- GUGGERLI, P.: Potato virus A and potato leaf roll virus: Purification, antiserum production, and serological detection in potato and test plants by ELISA. *Phytopathol. Z.* **96**, 97-107, 1979
- HUBBES, M.: Impact of molecular biology on forest pathology: A literature review. *Eur. J. For. Path.* **23**, 201-217, 1993.
- LÖW, A.: Untersuchungen zum ganzjährigen serologischen und immuncytologischen Nachweis von Cherry leafroll virus (CLRV) und Prune dwarf virus (PDV) in Wildkirsch (*Prunus avium*). PhD thesis, University of Bonn, 125 p. 1995.
- MASSALSKI, P. R., COOPER, J. I.: The location of virus like particles in male gametophyte of birch, walnut and cherry natural infected with cherry leafroll virus and its relevance to vertical transmission of the virus. *Plant Pathol.* **33**, 255-262, 1984.
- MASSALSKI, P. R., COOPER, J. I., HELLEN, C. U. T., EDWARDS, M. L.: The effect of chery leafroll virus infection on the performance of birch pollen and studies on virus replication in germinating pollen. *Ann. Appl. Biol.* **112**, 415-425, 1995.

- MAULE, A. J., WANG, D.: Seed transmission of plant viruses: a lesson in biological complexity. *Trends Microbiol.* **4**, 153-158, 1995.
- MILTENBURG, R.VAN, RÜGER, B., GRUNEWALD-JANHO, S., LEOUS, M., SCHROEDER, C.: The DIG-System User's Guide for Filter Hybridization. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, 100 p. 1995.
- NIENHAUS, F., CASTELLO, J.D.: Viruses in forest trees. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27**, 165-186, 1989.
- NOLASCO, G., DE BLAS, C., TORRES, V., PONZ, F.: A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Meth.* **45**, 201-218, 1993.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.: Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press, Inc., New York, 302 p. 1982.
- WERNER, R., MÜHLBACH, H.-P., BÜTTNER, C.: Detection of cherry leafroll nepovirus (CLRNV) in birch, beech and petunia by immunocapture-RT-PCR using a conserved primerpair. *Eur. J. For. Path.* **27**, 309-318, 1997.
- WERNER, R., MÜHLBACH, H.P., BÜTTNER, C.: Detection of poplar mosaic carlavirus by immunocapture-RT-PCR. In: *Diagnosis and identification of plant pathogens* (eds. H.-W. Dehne, G. Adam, M. Diekmann, J. Frahm, A. Mauler-Machnik, P. van Halteren), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 403-405, 1997.
- WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M., DUNEZ, J.: A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* **39**, 27-37, 1992.

(Manuskript eingelangt am 14. Dezember 2001, angenommen am 14. Jänner 2002)

Pflanzenschutzberichte
Band 60, Heft 1, 2002
ISSN 0031-675X

Einfluss des Befalls mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* auf Saatgutertrag und -qualität bei *Cyclamen persicum* MILL.

Influence of plant infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* on seed set and seed quality of *Cyclamen persicum* MILL.

ALOMA EWALD & ANNA ORLICZ-LUTHARDT

Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Grossbeeren/Erfurt e.V., Kühnhäuser Strasse 101, D-99189 Erfurt-Kühnhäusen

Zusammenfassung

Die Untersuchungen an der Cyclamensorte 'Reinweiß' zeigten, dass bei Pflanzen die mit dem Erreger der Cyclamenwelke, dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (FOCy) während der Bestäubung latent befallen waren, keine Einbußen sowohl im Saatgutertrag als auch in der Saatgutqualität auftraten. Eine Leistungsminderung, die allerdings meist nicht statistisch abgesichert werden konnte, wurde erst im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung sichtbar. Unabhängig vom Krankheitsverlauf bildeten alle Pflanzen vitalen Pollen. Während der Keimprüfung wurde FOCy nur bei einer sehr geringen Anzahl Samen nachgewiesen.

Stichwörter: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, Cyclamen, Saatgutertrag, Saatgutqualität

Summary

The studies on the cyclamen cultivar 'Reinweiß' showed that in plants latently infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* during pollination, no losses in the seed set as well as in the seed quality appeared. Only the plants pollinated in the advanced stage of disease showed a decreased performance, which in most cases was not statistically significant. Irrespectively of the course of disease, all plants developed viable pollen. During germination test, FOCy was detected only in a very low number of seeds.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*, Cyclamen, seed set, seed quality

Einleitung

Cyclamen persicum MILL. gehört in Deutschland mit jährlich ca. 25 Mio. Stück Topfware zu den wirtschaftlich bedeutendsten blühenden Topfpflanzen. Schätzungsweise werden in Nordeuropa 300 bis 400 Sorten vermarktet (GRUNEWALDT, 2000). Alle Sorten sind gegenüber dem Erreger der Cyclamenwelke, dem bodenbürtigen Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (weiterhin FOCy genannt) anfällig. Effiziente Pflanzenschutzmaßnahmen sind nicht möglich. Die Erkrankung kann in allen Entwicklungssta-

dien der Pflanze erfolgen und zu großen Ausfällen in der Cyclamenproduktion führen. Typische Symptome der Krankheit sind verstopfte Leitbündel und die daraus resultierende Welke oberirdischer Pflanzenteile.

Der Pilz schwächt die Pflanzen und führt letztendlich zu deren Absterben. Besonders gefährlich ist die Phase des latenten Befalls, deren Dauer sehr variabel ist und sich von einigen Tagen bis zu mehreren Monaten hinziehen kann. In dieser Phase werden die äußerlich noch symptomlosen Pflanzen wie gesunde betrachtet. Während Pflanzen mit eindeutigen Krankheitssymptomen in der Regel aus dem Bestand entfernt werden, verbleiben latent befallene und werden sowohl als mütterlicher als auch als väterlicher Kreuzungspartner in die Bestäubungen einbezogen.

Bisher sind keine Literaturangaben bezüglich des Einflusses der Welkekrankheit auf den Ertrag und die Qualität des Saatgutes bei Cyclamen bekannt. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob und im welchen Maße sich der Befall mit FOCy auf die generative Reproduktion und Qualitätsmerkmale des Saatgutes auswirkt.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen (Kabinengewächshaus konstant 18 – 20 °C) standen einjährige Pflanzen der diploiden Sorte 'Reinweiß' zur Verfügung. Mit Blühbeginn wurde jede Pflanze einmalig im Gießverfahren mit 40 ml einer Sporensuspension in der Konzentration 10^3 (Variante B) bzw. 10^6 (Variante C) Sporen/ml inokuliert. Variante A (Kontrolle) blieb unbehandelt. Als Sporensponder diente das FOCy-Isolat 62316 von der BBA Berlin. Der Versuch wurde in drei Wiederholungen mit jeweils 10 (Variante A) bzw. 15 Pflanzen je Wiederholung (Varianten B und C) angelegt.

Sichtbonituren der inokulierten Pflanzen fanden wöchentlich bis 24 Wochen nach der Inokulation (WnI) an Hand von Befallsstufen statt: O – optisch gesunde Pflanze; A – Symptome an bis zu fünf Blättern oder bis zu 50 % der Blätter mit Chlorosen; S – starke Befallssymptome an mehr als fünf Blättern oder mehr als 50 % der Blätter mit Chlorosen und T – abgestorbene Pflanze,

Drei Wochen nach der Inokulation begannen die Bestäubungen, die bis zur 20. WnI durchgeführt wurden. Die Pflanzen der inokulierten Varianten befanden sich während der Bestäubungen vorwiegend in den Befallsstufen A und S. Jeweils 10 – 15 Blüten pro Pflanze wurden zweimalig (Anthesebeginn und drei Tage später) bestäubt. Zur Verwendung kam ein Pollengemisch aller verfügbaren Pflanzen der zu bestäubenden Variante.

Die Bestimmung der Pollenvitalität (300 Pollenkörner/Probe) erfolgte von der 3. – 18. WnI wöchentlich sowie nach zehn Wochen Einlagerung der entsprechenden Proben bei +4°C mit Fluoreszeindiacetat in Anlehnung an eine Färbemethode von HESLOP-HARRISON und HESLOP-HARRISON (1970). Befallsstufen innerhalb der Varianten wurden bei der Pollenabnahme nicht berücksichtigt.

Die Ernte der Samenkapseln erfolgte mit dem Weichwerden der Blütenstiele. Alle Kapseln wurden unmittelbar nach der Ernte mit Bacillol oberflächlich desinfiziert.

Um die Ursache der Erkrankung zu bestätigen, fand nach der Samenernte die Reisolierung des Erregers aus den Knollen inokulierter Pflanzen statt.

Die Tausendkornmasse (TKM) errechnete sich nach Auswiegen von je acht willkürlich gezogenen Proben à 100 Samen nach ISTA-Vorschrift (1993).

Die Keimfähigkeit von jeweils 4 x 50 Samen wurde sowohl auf Filterpapier als auch in Substrat im Dunkeln bei 20 °C geprüft. Der Anteil normale Keimlinge wurde wöchentlich 14 - 35 Tage nach Auflegen der Samen nach ISTA-Vorschrift (1979) bestimmt. Normale Keimlinge, unvollständig gekeimte Samen und nicht gekeimtes Saatgut aus der Keimprüfung auf Filterpapier wurden bis zehn Wochen nach Auflegen der Samen auf FOCy-Befall bzw. -kontamination untersucht.

Statistische Berechnungen

Die Auswertung erfolgte durch Varianzanalysen und anschließende Mittelwertvergleiche mittels Newman-Keuls- (Pollenvitalität, TKM, Keimfähigkeit) und Tukey-Test. (Anteil abortierter Blüten, Samenzahl/Kapsel). Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug $\alpha = 5\%$.

Ergebnisse

Befallsverlauf

Sowohl zwischen den Pflanzen einer Variante als auch zwischen den inokulierten Varianten B und C zeigten sich Unterschiede im Befallsverlauf. Während einige Pflanzen sehr zeitig erste Krankheitssymptome ausprägten und die einzelnen Befallsstufen sehr schnell durchliefen, war dieser Vorgang bei anderen verzögert.

Bereits zu Beginn der Bestäubungen (3 WnI) traten Welkesymptome in den Befallsstufen A und S (Tabelle 1) auf. Ab der 11. WnI waren alle Pflanzen sichtbar krank. Der Anteil Pflanzen mit Befallsstufe S stieg bei beiden Varianten kontinuierlich an, so daß sich zum Abschluss der Bestäubungen in der 20. WnI in Variante B über 75 % der Pflanzen in dieser Befallsstufe befanden. In Variante C, die sich durch einen schnelleren Krankheitsverlauf auszeichnete, waren zu diesem Zeitpunkt schon über 77 % der Pflanzen abgestorben. Zum Ende der Kapselernte (24 WnI) betrug der Anteil abgestorbener Pflanzen in Variante B 17,8 % und in Variante C 95,5 %.

Tabelle 1: Anteil Pflanzen (%) der Befallsstufen O, A, S und T in den Varianten B und C 3 – 24 Wochen nach der Inokulation (WnI), n = 45 Pflanzen

Table 1. Percentage of plants (%) of stages O, A, S and T in the variants B and C 3 – 24 weeks after inoculation, n = 45 plants

WnI	Variante B				Variante C			
	Befallsstufen				Befallsstufen			
	O	A	S	T	O	A	S	T
3	35,6	55,6	8,8	0,0	48,9	46,7	4,4	0,0
7	4,4	40,0	53,3	2,2	6,7	66,7	26,7	0,0
11	0,0	33,3	64,4	2,2	0,0	53,3	46,7	0,0
15	0,0	20,0	77,8	2,2	0,0	13,3	55,6	31,1
20	0,0	15,6	75,6	8,9	0,0	0,0	22,2	77,6
24	0,0	0,0	82,2	17,8	0,0	0,0	4,4	95,5

Pollenvitalität

Pflanzen der inokulierten Varianten unterschieden sich über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht signifikant von unbehandelten Pflanzen. Deformierte Pollenkörner wurden unabhängig von der Befallsstufe vereinzelt beobachtet. Auch nach Einlagerung des Pollens über zehn Wochen unterlag die Pollenvitalität keinen Veränderungen.

Saatgutertrag

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle abortierte in den inokulierten Varianten im Mittel aller Befallsstufen eine höhere Anzahl bestäubter Blüten (Tabelle 2). In Variante C lag der Anteil Aborte bei Pflanzen die in Befallsstufe O bestäubt wurden, unter dem der Kontrolle. Unter Berücksichtigung der Einzelpflanzenwerte unterschieden sich in Variante C die Befallsstufen O und C signifikant voneinander. Der mittlere Anteil abortierter Blüten nahm in den Varianten B und C mit Fortschreiten der Erkrankung zu. Zwischen den Varianten und Befallsstufen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mittleren Samenzahl je Kapsel. Bei Pflanzen der inokulierten Varianten, ab Befallsstufe A bestäubt, sanken die mittleren Samenzahlen je bestäubte Blüte deutlich ab (Tabelle 2).

Tabelle 2: Einfluss der Inokulation mit FOCy auf den Anteil abortierter Blüten und die mittlere Anzahl Samen je Kapsel bzw. je bestäubte Blüte in Abhängigkeit von der Befallsstufe zum Bestäubungstermin, n = 30 bzw. 45 Pflanzen

Table 2: Effect of inoculation with FOCy on the proportion of aborted flowers and on average number of seeds per pod and per pollinated flower in dependence on the stages at pollination, n = 30 or 45 plants

Variante	Befallsstufe	bestäubte Blüten	Aborte (%)	Samen/Kapsel	Samen/bestäubte Blüte
A (Kontrolle)	ohne	554	17,9 (ab)	60,8	50,4
B (10 ³)	O	119	20,1 (ab)	78,2	48,6
	A	396	35,1 (ab)	64,1	33,7
	S	342	45,9 (ab)	49,3	19,7
C (10 ⁶)	O	83	6,3 (a)	79,8	62,7
	A	403	27,3 (ab)	57,0	38,0
	S	224	65,3 (b)	51,5	15,8

ab = Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander

ab = values with different letters differ significantly at $p \leq 0.05$

Saatgutqualität

Zum Zeitpunkt der Samenernte befanden sich in den inokulierten Varianten mehr als 70 % der Pflanzen in Befallsstufe S. Von bereits abgestorbenen Pflanzen wurden 3,3 % (B) bzw. 25,4 % (C) der Kapseln geerntet.

Samen der Varianten A und B unterschieden sich in ihrem Entwicklungszustand kaum voneinander (Tab. 3). In Variante C wurde über alle Befallsstufen der niedrigste Anteil Kapseln mit optisch normal entwickelten Samen geerntet. Der Anteil Kapseln ohne Samen lag hier, insbesondere bei den in Befallsstufe S bestäubten Blüten, wesentlich über dem der anderen Varianten (Tab 3).

Tabelle 3: Entwicklungszustand der Samen nach Bestäubung von Blüten in unterschiedlichen Befallsstufen

Table 3: Stage of development of seeds after pollination of flowers in different stages of contamination

Variante/ Befallsstufe	Kapseln ohne Samen (%)	Samen	
		gesamt	davon normal entwickelt (%)
A (Kontrolle)	7,4	27930	100,0
B (10 ³) O	5,4	5786	100,0
A	3,6	15189	100,0
S	4,4	11224	99,9
C (10 ⁶) O	8,1	5304	89,8
A	13,0	15609	91,0
S	25,6	3538	83,7

Über alle Befallsstufen bildeten Pflanzen der Variante C Samen mit der signifikant niedrigsten TKM (Abb. 1). Zwischen der Kontrolle und Variante B ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Keimprüfung auf Filterpapier (Abb. 2a) hatten Samen der Variante B, Befallsstufe S eine signifikant geringere Keimfähigkeit. Alle anderen Proben unterschieden sich nicht voneinander. In Substrat (Abb. 2b) war in den inokulierten Varianten ab Befallsstufe A ein Absinken der Keimfähigkeit zu verzeichnen. Über alle Befallsstufen unterschieden sich beide Varianten nur wenig voneinander. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten nur Samen der Variante C, Befallsstufe S eine signifikant geringere Keimfähigkeit.

Varianten und Befallsstufen zum Zeitpunkt der Bestäubung

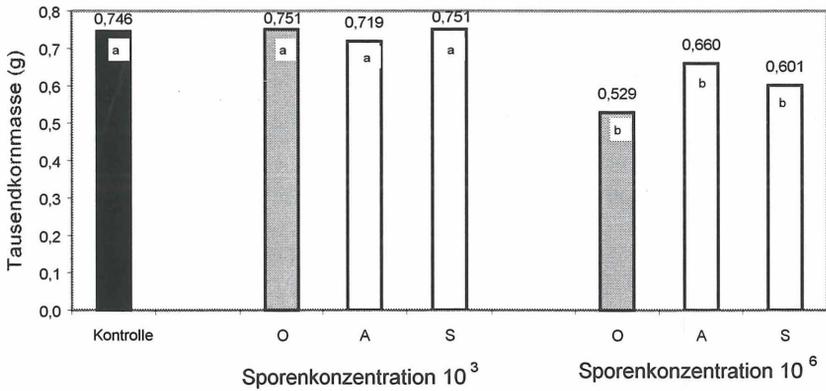


Abbildung 1: Vergleich der Tausendkorngewichte (TKM) zwischen den Varianten und Befallsstufen der Pflanze zum Zeitpunkt der Bestäubung ab = Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander

Figure 1: Comparison of weight of 1000 seeds between the variants and stages of contamination of plant at pollination, ab = values with different letters differ significantly at $p \leq 0.05$

Varianten und Befallsstufen zum Zeitpunkt der Bestäubung

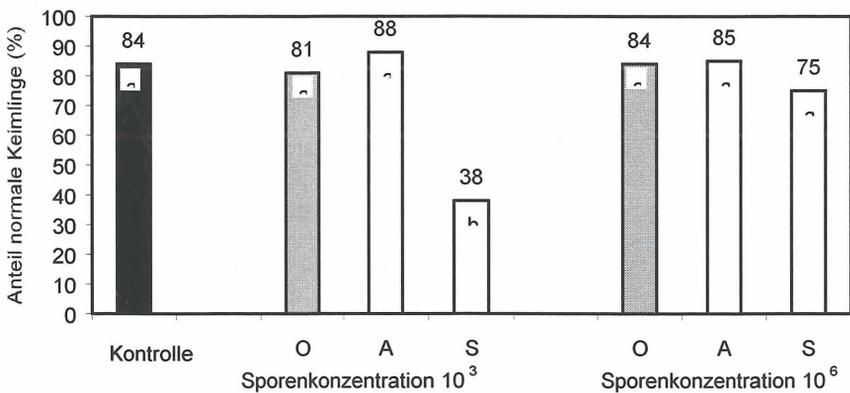


Abbildung 2a: Keimprüfung auf Filterpapier 35 Tage nach Auflegen der Samen ab = Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander

Figure 2a: Germination on top of paper 35 days after sowing, ab = values with different letters differ significantly at $p \leq 0.05$

Varianten und Befallsstufen zum Zeitpunkt der Bestäubung

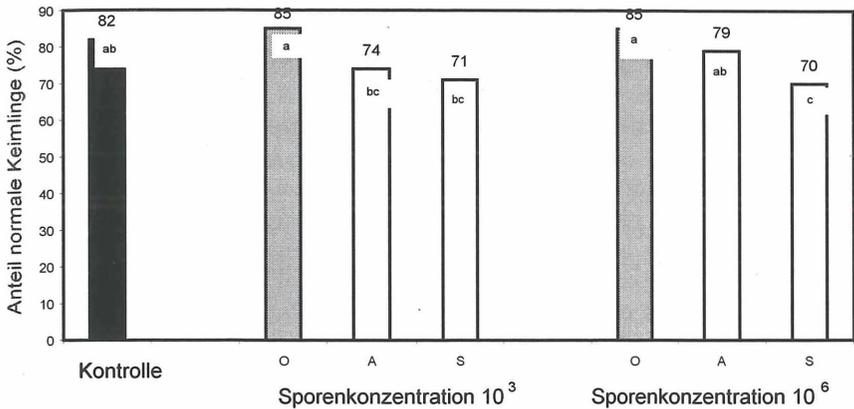


Abbildung 2b: Keimprüfung in Substrat 35 Tage nach der Aussaat ab = Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich bei $p \leq 0,05$ signifikant voneinander
 Figure 2b: Germination in substrate 35 days after sowing, ab = values with different letters differ significantly at $p \leq 0.05$

Nachweis des Erregers

In allen Knollen der inokulierten Varianten wurden die für *Fusarium*-Befall typischen Verbräunungen der Leitbündel in unterschiedlicher Ausprägung festgestellt. Nach Auflegen von Knollenscheiben auf Medium konnte ausnahmslos FOcy nachgewiesen werden (GERLACH und NIRENBERG, 1982; CHAMPION, 1997; SEIFERT, 2000). Die Knollen der Kontrollpflanzen blieben *Fusarium* frei.

Von 1067 normalen Keimlingen die aus der Keimprüfung auf Filterpapier zur Verfügung standen, wurde zehn Wochen nach Auflegen der Samen bei vier (Variante B, Befallsstufe A; Variante C, Befallsstufen O und A) *Fusarium* nachgewiesen. Von 262 unvollständig oder nichtgekeimten Samen waren sechs bzw. zehn Wochen nach dem Auflegen neun (Variante B, Befallsstufen O und A, Variante C, Befallsstufe A) mit dem Erreger infiziert.

Diskussion

In der zahlreichen Literatur zur *Fusarium*-Welke bei Cyclamen wurde bisher die Problematik des Einflusses dieser Krankheit auf den Saatgutertrag und die Qualität der Samen, Keimlinge und nachfolgend auf die Produktion von Jungpflanzen unter diesem Gesichtspunkt nicht betrachtet. Durch den Verschluss von Leitbündeln, bedingt durch die Erkrankung, und die somit verminderte Versorgungsfunktion der generativen Organe, wäre ein Absinken der Pollenvitalität und anderer Leistungsparameter zu erwarten gewesen. Das konnte in vorliegenden Untersuchungen nur bedingt bestätigt werden. Latent befallene Pflanzen unterschieden sich nicht von gesunden Pflanzen. Bedingt durch eine höhere Anzahl abortierter Blüten bildeten erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit bestäubte Blüten eine geringere Anzahl Samen. Der Pollen erkrankter Pflanzen zeigte keine verminderte Vitalität.

Dass *Fusarium*-Befall einen Einfluss auf die Samenbildung und deren Qualität haben kann, zeigt eine Studie der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg 1998/1999 (1999). Durch *Fusarium* ssp. geschädigte Weizenkörner zeigten Schadsymptome am Korn wie Schrumpfung (Schmachtkorn) und eine graue filzige Oberfläche. Ähnlich dieser Studie war auch in den eigenen Untersuchungen das spezifische Gewicht der Samen stark kontaminierter Pflanzen (Variante C) geringer als das der Kontrolle und der Variante A. Das bedeutet, dass der Welkeerger in einer niedrigen Konzentration zwar die Pflanze schwächt, aber es ihr trotzdem ermöglicht, noch über eine längere Zeit normal entwickeltes Saatgut zu produzieren. Die deutlich geringere Tausendkorntmasse der Samen aus Variante C stand in keiner Beziehung zur Keimfähigkeit.

Während der Keimprüfung auf Filterpapier wurde in Proben der Befallsstufe S der Variante B eine sehr starke Kontamination der Samen mit dem Pilz *Chaetomium* sp. beobachtet. Diese Samen zeigten gleichzeitig eine sehr niedrige Keimfähigkeit. Keinen erkennbaren Einfluss hatte der Pilz offenbar auf die Keimfähigkeit der Samen in Substrat.

Die Pilze der Gattung *Chaetomium* gehören in der Mehrheit zwar zu den Saprophyten, einige Arten sogar zu den Antagonisten der Erreger von Blattkrankheiten, z. B. *Helminthosporium victoriae* bei Hafer (TVEIT und MOORE, 1954), Fusariose bei Haferkeimlingen (TVEIT und WOOD, 1955), es treten jedoch auch pathogene Arten, wie z. B. *Chaetomium sulphureum* bei Kümmel, (RATHORE, SOLANKI und BISNOI, 1990) auf SKOLKO und GROVES (1948) bzw. ROY (nach RICHARDSON, 1990) haben festgestellt, daß bei einigen sehr stark mit *Chaetomium* spp. kontaminierten Samenpartien von Hafer bzw. Reis, niedrige Keimraten zu verzeichnen waren. Diese wurden nachweislich durch *Chaetomium* spp. verursacht.

Die Keimprüfung in Substrat entspricht den Bedingungen in der Praxis am ehesten. Sie stellt eine größere Beanspruchung für den keimenden Samen dar, so dass hier Qualitätsmängel deutlicher ausgeprägt werden als in der Petrischale. Das bestätigten die gewonnenen Ergebnisse.

Als Ursache für das Auftreten des Erregers in einigen wenigen Keimlingen während der Keimprüfung auf Filterpapier wird die Übertragung von der Kapselschale anhaftenden Sporen auf die Samenoberfläche während der Ernte vermutet.

Aufgrund des durchgeführten Versuches könnte der Eindruck entstehen, daß bei leichtem (latentem) FOCy-Befall Cyclamenbestände bestäubt und Saatgut produziert werden kann, da der Pilz kaum Einfluss auf den Ertrag und die Qualität der Samen hat. Solche Schlussfolgerungen wären jedoch gefährlich. Auch wenn die direkte FOCy-Übertragung von der infizierten Mutterpflanze in das Saatgut während der Samenentwicklung als wenig wahrscheinlich erscheint, bleibt immer die Gefahr der Verschleppung des Erregers von erkrankten auf die gesunden Pflanzen bei normaler, gärtnerischer Bearbeitung der Cyclamenbestände bestehen. Außerdem ist bisher nicht bekannt, ob und welche Auswirkungen Samen, die nach Bestäubung latent befallener Pflanzen gebildet wurden, auf die weitere Entwicklung und Gesundheit der Jungpflanzen haben. Weitere Versuche zur Klärung dieses Problems werden zur Zeit fortgeführt.

Literatur

CHAMPION, R.: Erkennen und Bestimmen samenübertragbarer Pilze. - Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, Samenübertragbare Pilze, Sonderausgabe zu Band 52 (70), 1999. In „Identifier les champignons transmis par les semences, INRA, Paris 1997.

GERLACH W., NIRENBERG, H.: The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. - Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin – Dahlem, Heft 209, 1-406, 1982.

GRUNEWALDT, J.: Genetische Ressourcen für die Zierpflanzenzüchtung. - Schriften zu genetischen Ressourcen der ZADI, Band 15, Tagungsband zum Symposium Erhaltung und nachhaltige Nutzung genetischer Ressourcen der Zierpflanzen. 27. – 28. September 2000 in Königswinter, 45-56, 2000.

HESLOP-HARRISON, J. und HESLOP-HARRISON, Y.: Evaluation and pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. - Stain Technology 45, 115-120, 1970.

ISTA: Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut. - Seed Science and Technology, Vol. 1, 1993.

ISTA: Handbuch für die Keimlingsbeurteilung, 1979.

Landwirtschaftliche Universität Halle-Wittenberg: Zum *Fusarium*-Befall in Winterweizen der Ernte 1999 in Sachsen Anhalt. Internetseite <http://www.landw.uni-halle.de/lufa-lsa/themen/futtermittel/fusarium.htm>. 1999.

RATHORE, R. S., SOLANKI, J. S., BISNOI, H. R.: A new leaf spot disease of cumin. - Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 20, (3), 279-281, 1990.

RICHARDSON, M. J.: An annotated list of seed-borne diseases, - ISTA, 4th Edition, 1990.

SEIFERT, K.: FusKey – *Fusarium* Interactive Key, - Internetseiten: <http://res.agr.ca/brd/fusarium>, 2000.

SKOLKO, A. J., GROVES, J. W.: Notes on seed borne fungi V. *Chaetomium*. - Canad. J. Res. C, 26, 269-280, 1948.

TVEIT, M., MOORE, M. B.: Isolates of *Chaetomium* that protect oats from *Helminthosporium victoriae*. - Phytopathology 44 (12), 686-689, 1954.

TVEIT, M., WOOD, R. K. S.: The control of *Fusarium* blight in oat seedlings with antagonistic species of *Chaetomium*. - Ann. Appl. Biol., 43, 538-552, 1955.

(Manuskript eingelangt am 10. Jänner 2002, angenommen am 17. Jänner 2002)

***Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* an Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) Untersuchungen zur Biologie und Epidemiologie**

***Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* on St. John's-wort (*Hypericum perforatum* L.) - biological and epidemiological studies**

UTE GÄRBER¹⁾ und REGINA SCHENK²⁾

¹⁾ Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau. Außenstelle Kleinmachnow, Stahnsdorfer Damm 81, D – 14532 Kleinmachnow;

²⁾ Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-gärtnerische Fakultät, Albrecht-Thaer-Weg 5, D-14195 Berlin

Zusammenfassung

Das Auftreten der Johanniskrautwelke stellt für den Anbau von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) eine große Gefahr dar. Als Ursache für die Krankheit wurde der Pilz *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* diagnostiziert. Um den Erreger wirksam bekämpfen zu können, war es notwendig, Kenntnisse zu der bislang noch unerforschten Biologie und Epidemiologie des Erregers zu erhalten. In Untersuchungen mit verschiedenen Isolaten von *Colletotrichum* unterschiedlicher Herkunft wurde nachgewiesen, dass der Erreger auf Johanniskraut spezialisiert ist und eine hohe Aggressivität aufweist. Der Erreger befällt die Pflanze in verschiedenen Entwicklungsstadien. Im Keimlings- und Jungpflanzenstadium reagieren die Pflanzen stark anfällig. Geringe Inokulumdichten (10^2) können bereits stärkere Ausfälle an Jungpflanzen (20%) verursachen. Konidien des Pilzes sind in erster Linie für die Verbreitung des Erregers im Bestand, Askosporen für die Überdauerung des Pilzes von Bedeutung. Untersuchungen zum Krankheitsverlauf an den Sorten 'Topaz', 'Hyperixtrakt' und 'Motiv' zeigten, dass zwischen den Sorten große Unterschiede in der Anfälligkeit für die Johanniskrautwelke bestehen.

Stichwörter: *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*, *Hypericum perforatum*, Biologie, Epidemiologie, Infektionsmethoden

Summary

Wilt of St. John's wort is a great danger in the growing of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). The disease is caused by the fungus *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides*. To be able to efficiently control the pathogen, it was necessary to gather knowledge about the biology and epidemiology of the fungus, which were largely unknown before. Studies with a number of isolates of *Colletotrichum* of various origins have shown that the pathogen is specialised on St. John's wort and that it is very aggressive. The patho-

gen attacks the plant at various growth stages. The plants are particularly susceptible during the germinating and seedling stages. Feeble inoculum densities (10^2) are able to cause quite high losses (20 %) in young plants. The fungal conidia play a role in spreading the pathogen in the crop, while the ascospores are responsible for its endurance. Studies about the disease curve made with the varieties 'Topaz', 'Hyperixtract', and 'Motiv' showed that there are great varietal differences in susceptibility to the wilt disease.

Key words: *Colletotrichum cf. gloeosporioides*, *Hypericum perforatum*, biology, epidemiology, infection methods

Einleitung

Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) ist eine Heilpflanze, die in der Humanmedizin zur Behandlung psychovegetativer Störungen und depressiver Verstimmungszustände eingesetzt wird. In den 90ziger Jahren war im Anbau von Johanniskraut eine stark steigende Tendenz zu verzeichnen. Der Anbau erreichte in Deutschland Ende der 90ziger Jahre einen Umfang von mehr als 500ha (HOPPE, 2000). Dem gegenüber stand eine damals noch unbekannte Krankheit, die sogenannte Johanniskrautwelke. Aufgrund fehlender Kenntnisse zur Krankheitsursache konnten den Anbauern keine wirksamen Gegenmaßnahmen empfohlen werden. Aus dieser Situation heraus entstand Ende 1997/Anfang 1998 ein von der pharmazeutischen Industrie gefördertes Forschungsvorhaben, an dem vier Forschungseinrichtungen – die Fachhochschule Weihenstephan, Pharmaplant Artern, die Humboldt-Universität Berlin (HUB) und die Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)- beteiligt waren. Das Ziel des dreijährigen Forschungsvorhabens bestand darin, nach Untersuchungen zur Ätiologie detaillierte Kenntnisse zur Biologie und Epidemiologie des Erregers zu erarbeiten, um darauf aufbauend gezielt Möglichkeiten zur Bekämpfung prüfen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wird der Erreger der Johanniskrautwelke vorgestellt einschließlich der Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität und Aggressivität, zu den Infektionsbedingungen, zum Einfluss der Inokulumdichte und zur Bedeutung der Fruchtkform des Pilzes.

Material und Methoden

Erregermaterial

Der Stamm von *Colletotrichum cf. gloeosporioides* mit der Kenn-Nr. 100 diente in allen Untersuchungen als Standard- bzw. Vergleichsisolat. In die Untersuchungen zur Pathogenität wurden neben zwei Isolaten von Johanniskraut zehn *Colletotrichum*- bzw. *Glomerella*-Isolate verschiedener Wirtspflanzenherkünfte (*Erica gracilis*, *Crassula spec.*, *Calluna vulgaris*, *Alnus cordata*, *Ligustrum vulgare*, *Sambucus nigra*, *Phalaenopsis spec.*) einbezogen. Für vergleichende Prüfungen zur Aggressivität von *Colletotrichum cf. gloeosporioides* wurden zehn Isolate verschiedener Herkunftsorte Deutschlands ausgewählt.

Pflanzenmaterial

In den Untersuchungen wurden als Standard bzw. Vergleichsvarianten die Sorten 'Motiv', 'Hyperextrakt' und 'Topaz' verwendet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte nach der Kulturanleitung von BOMME (1986). Für die Prüfung an Einzelpflanzen wurden die Keimlinge in Multitopfpaletten pikiert bzw. je nach Versuchsfrage aus den Multitopfpaletten nach etwa vier- bis sechswöchiger Kultivierung in 13er Töpfe gepflanzt.

Infektionsmethoden

Die Anzucht und Vermehrung des Erregers erfolgte nach den von Gärber und Schenk (2002) entwickelten Methoden, die für verschiedene Fragestellungen erprobt wurden. Die Pflanzen wurden inokuliert, indem die Erregersuspension in unterschiedlichen Verfahren und an unterschiedliche Pflanzenteile ausgebracht wurde:

A. Inokulation der Wurzeln durch Eingießen von 50ml Konidien suspension in das Pflanzloch beim Umtopfen der Jungpflanzen in 13er Töpfe

B. Inokulation der Blätter und Stängel durch Übersprühen von 6 bis 7 Wochen alten Pflanzen mit einer Konidien suspension (30 ml pro Pflanze in 13er Töpfen)

C. Inokulation der Pflanzen am Stängelgrund durch Angießen mit 1 ml Erregersuspension (Konidien- oder Askosporensuspension) bei Jungpflanzen in Multitopfpaletten bzw. 30 ml Erregersuspension bei etwa 7 Wochen alten Jungpflanzen in 13er Töpfen.

Die Inokulumsdichte betrug jeweils 10^6 . Bei den Inokulationsmethoden B und C wurden die Pflanzen nach der Inokulation für 24 bis 36 Stunden mit einer Folie abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchte zu gewährleisten.

Die Multitopfpaletten bzw. Töpfe wurden in Blöcken auf Tische im Gewächshaus bei Temperaturen von 23°C am Tag und 15°C in der Nacht und 80% R.L. aufgestellt. In der lichtarmen Zeit wurde eine Zusatzbelichtung von 6.00 Uhr bis 22.00 Uhr eingeschaltet. Zur Abtrennung der einzelnen Prüfvarianten wurden Schotten aus Plexiglas aufgestellt, um Mischinfektionen zu vermeiden.

Der Prüfumfang in den Versuchen mit Topfpflanzen umfasste pro Variante 10 bis 15 Töpfe. Bei der Prüfung in Multitopfpaletten wurden zwei bis drei Wiederholungen pro Variante (eine Multitopfpalette entspricht einer Wiederholung). Zum Vergleich wurde jeweils eine nicht inokulierte Kontrollvariante (UK) einbezogen.

Versuchsauswertung

Die Ausprägung von Krankheitssymptomen an Topfpflanzen wurde für eine Dauer von 25 bis 35 Tage nach Inokulation beobachtet und die Stärke des Befalls in etwa dreitägigen Abständen mit Befallsbeginn mit Hilfe selbst erarbeiteter Boniturschemata (1-kein Befall, 5- sehr starker Befall) eingeschätzt.

Der Krankheitsbefall an Jungpflanzen in Multitopfpaletten wurde bewertet, indem mit Befallsbeginn die abgestorbenen, kranken und gesunden Pflanzen in etwa dreitägigen

Abständen gezählt wurden. Als krank wurden alle Pflanzen bezeichnet, die Läsionen an einem oder mehreren Trieben aufwiesen bzw. welk waren.

Ergebnisse

Krankheitsursache und Schadbild

Zur Ätiologie der Johanniskrautwelke und Symptomatologie wurden erste Untersuchungen von Gerlach (1997) und Gärber (1999) veröffentlicht. Bei dem Erreger handelt es sich um *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* (Teleomorph: *Glomerella* cf. *cingulata*), der an Johanniskraut eine Anthraknose verursacht. An Jungpflanzen sind die vom Erreger gebildeten Acervuli häufig am Stängel unterhalb der Keimblätter zu finden. Oberhalb der Befallsstellen beginnen die Keimlinge zu welken und sterben ab. In den mit Setae besetzten Acervuli werden einzellige, hyaline Konidien gebildet, die als schleimige, lachsfarbene Konidienmasse makroskopisch sichtbar sind. Im Feldbestand wird an den Pflanzen zunächst häufig ein Erschlaffen der Triebspitzen beobachtet. Mit Fortschreiten der Krankheit beginnen einzelne Triebe zu welken, die später an der Stängelsbasis infolge der Umgürtelung durch den Erreger umknicken. Die Pflanzen verbräunen und sterben völlig ab. An holzigen Pflanzenteilen findet man häufig auch die Hauptfruchtform des Pilzes. Eine Besonderheit des Pilzes besteht darin, dass er in vitro neben Acervuli nach etwa zehntägiger Kulturdauer reichlich Perithezien mit Askosporen bildet.

Pathogenität von *Colletotrichum* anderer Wirtspflanzenherkünfte

Da in den vergangenen Jahren an Zierpflanzen und Gehölzen verstärkt *Colletotrichum* spp. bzw. *Glomerella cingulata* als Erreger nachgewiesen wurde, sollte geprüft werden, ob diese pathogenen Formen auch an Johanniskraut einen Krankheitsbefall verursachen können. In den Infektionsversuchen (Inokulationsmethode A und B) erwiesen sich nur die von Johanniskraut isolierten Stämme als pathogen, wobei die Sorten unterschiedlich anfällig reagierten (Abb. 1). Die von anderen Wirtspflanzenherkünften isolierten Pilze waren an Johanniskraut nicht pathogen, unabhängig davon, welches Inokulationsverfahren angewandt wurde. Die Ergebnisse zur Pathogenität ergänzen die Kenntnisse aus der Literatur, dass es sich bei *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* um eine auf Johanniskraut spezialisierte Form handelt.

Pathogenität von *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* an Kartoffel

Kartoffelpflanzen im Stadium 14 bis 16 wurden durch Übersprühen mit einer Konidien-suspension von *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* inokuliert und auf Befallssymptome kontrolliert. Nach etwa 3 Wochen waren am Stängel der Kartoffel strichförmige, braune Läsionen zu beobachten, aus denen der Pilz reisoliert werden konnte. Die Kartoffelpflanzen zeigten leichte Welkeerscheinungen, erholten sich aber wieder. Im weiteren Beobachtungszeitraum nahmen die Krankheitssymptome nicht weiter zu.

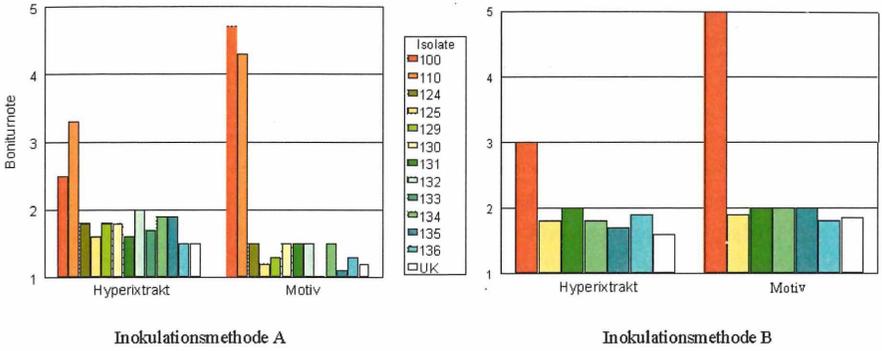


Abb.1: Pathogenität von *Colletotrichum* spp. anderer Wirtspflanzenherkünfte an Johanniskraut

Fig. 1: Pathogenicity of *Colletotrichum* isolates of other host plant origins to St. John's wort

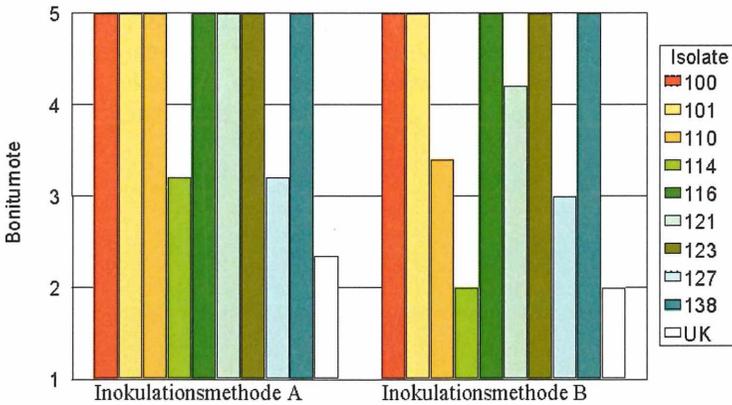


Abb. 2: Pathogenität von *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* verschiedener Herkunfts-orte an Johanniskraut

Fig. 2: Pathogenicity of *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* of various places of origin to St. John's wort

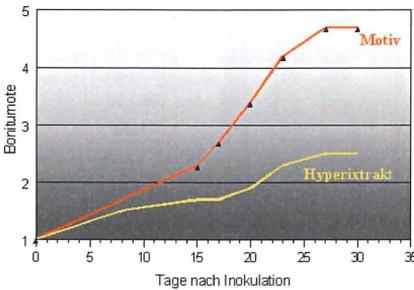
Pathogenität von *Colletotrichum cf. gloeosporioides* verschiedener Herkunftsorte an Johanniskraut

In den Untersuchungen wurde eine sehr starke Aggressivität des Erregers ermittelt (Abb. 2).

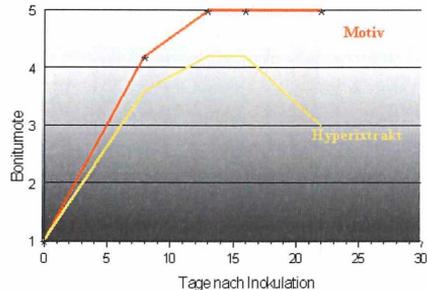
Alle getesteten Isolate aus verschiedenen Anbaugebieten Deutschlands waren pathogen. Bei einem Eingießen der Erregersuspension in das Pflanzloch wurden insgesamt höhere Befallswerte erreicht als bei einem Übersprühen der Pflanzen. Offensichtlich konnten sich die Pflanzen bei einem Aufsprühen der Erregersuspension auf die Blätter und Triebe nach längerer Versuchsdauer regenerieren. Bei einer Anreicherung des Erregers am Stängelgrund scheint sich dagegen die Pflanze nur schwer zu erholen. Die Versuchsergebnisse zur Pathogenität zeigen, dass es sich bei *Colletotrichum cf. gloeosporioides* um einen Erreger mit einer hohen Aggressivität handelt. Die Isolate 114 und 124 mit einer geringeren Aggressivität lassen keinen Zusammenhang zum Herkunftsort erkennen.

Krankheitsverlauf bei verschiedenen Inokulationsverfahren

Der Krankheitsverlauf wurde an der anfälligen Johanniskrautsorte 'Motiv' und der weniger anfälligen Sorte 'Hyperixtrakt' bei Inokulation nach Methode A und B beobachtet. Beide Inokulationsverfahren führten zu hohen Infektionsergebnissen (Abb. 3). Bei Inokulation der Pflanze über den Boden baut sich der Befall kontinuierlich auf. Nach ca. 14 Tagen wurden erste Welkesymptome an der anfälligen Sorte 'Motiv' beobachtet. Während an der weniger anfälligen Sorte 'Hyperixtrakt' 30 Tage nach Inokulation nach wie vor kein nennenswerter Befall auftrat, waren die Pflanzen der anfälligen Sorte 'Motiv' nahezu alle abgestorben. Bei einer Infektion durch Übersprühen der Pflanzen wurde zunächst an beiden Sorten deutliche Krankheits Symptome in Form von Nekrosen an Blättern und Stängeln beobachtet. Während die weniger anfällige Sorte 'Hyperixtrakt' ca. 14 Tage nach Inokulation begann, sich zu erholen und starken, gesunden Neuaustrieb zu bilden, schritt bei der Sorte 'Motiv' die Krankheit weiter voran.



Inokulationsverfahren A



Inokulationsverfahren B

Abb.3: Krankheitsverlauf der Johanniskrautwelke bei verschiedenen Inokulationsverfahren

Fig. 3: Disease curve of wilt of St. John's wort with various methods of inoculation

Die Beobachtungen zum Krankheitsverlauf ergaben, dass bei einer Inokulation der Pflanze am Stängelgrund dem natürlichen Infektionsweg offenbar am stärksten entsprechen wird. In weiterführenden Untersuchungen wurde daher ausschließlich das Inokulationsverfahren C angewandt, bei dem die Erregersuspension unmittelbar an den Stängelgrund der Pflanze ausgebracht wird.

Einfluss der Inokulumdichte auf die Krankheitsentwicklung

In den Abbildungen 4 und 5 sind die Infektionsverläufe bei unterschiedlichen Inokulumdichten für die unterschiedlich anfälligen Sorten ‘Hyperixtrakt’, ‘Topaz’ und ‘Motiv’ dargestellt. An Jungpflanzen in Multitopfaletten (Abb. 4) wurden bei geringen Inokulumdichten von 10 bis 10^2 Konidien/ml Suspension ein z.T. starker Krankheitsbefall von bis zu 25% festgestellt. Sichere Infektionsergebnisse wurden jedoch erst bei höheren Inokulumdichten erreicht. Bei einer Inokulumdichte von 10^4 kann sich die Infektion in relativ kurzer Zeit aufbauen. Andererseits ist der Infektionsdruck nicht zu hoch, so dass Unterschiede in der Anfälligkeit der geprüften Sortengut gut erkennbar sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Prüfung an Topfpflanzen erzielt (Abb. 5). Pflanzen in späteren Entwicklungsstadien sind jedoch bedeutend weniger anfällig als Jungpflanzen. Bei den niedrigen Konidiendichten von 10 und 10^2 war kein bzw. nur geringer Befall zu verzeichnen. Mit einer Konidiendichte von 10^4 wurden gleichfalls sichere Infektionsergebnisse erzielt. Bei den Sorte ‘Motiv’ und ‘Topaz’ baute sich die Infektion sehr schnell auf. Innerhalb einer Woche nach Inokulation war die Mehrzahl der Pflanzen stark befallen. Deutlich widerstandsfähiger zeigte sich die Sorte ‘Hyperixtrakt’

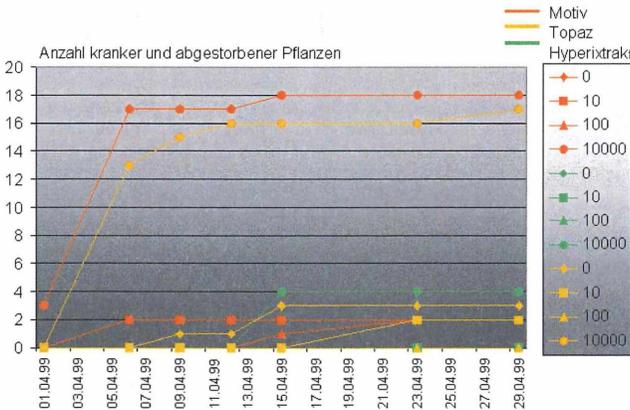


Abb. 4: Einfluss der Inokulumdichte auf die Krankheitsentwicklung an getopften Pflanzen

Fig. 4: Influence of inoculum density on the development of disease on potted plants

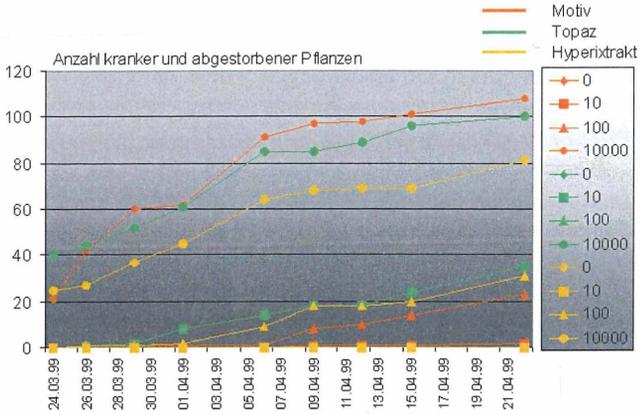


Abb. 5: Einfluss der Inokulumdichte auf die Krankheitsentwicklung an Jungpflanzen
 Fig. 5: Influence of inoculum density on the development of disease on young plants

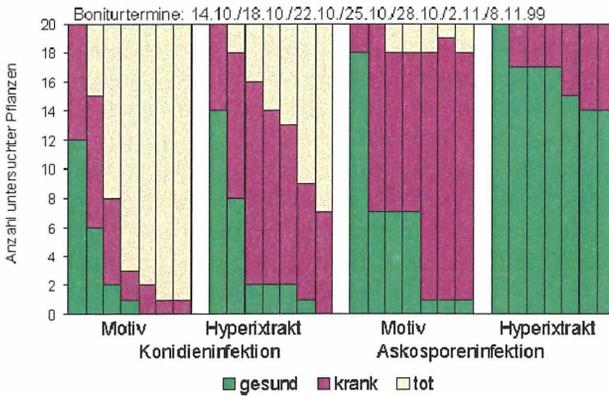


Abb. 6: Krankheitsentwicklung an Topfpflanzen bei einer Konidien- und Askosporenfektion
 Fig. 6: Development of disease on potted plants with infection by conidia and infection by ascospores

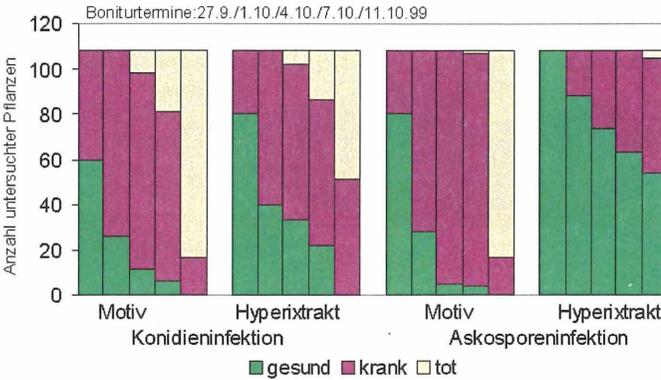


Abb. 7: Krankheitsentwicklung an Jungpflanzen bei einer Konidien- und Askosporenfektion

Fig. 7: Development of disease on young plants with infection by conidia and infection by ascospores

Krankheitsentwicklung bei einer Konidien- und Askosporenfektion

Mit diesen Untersuchungen sollte die Bedeutung der verschiedenen Fruchtformen des Pilzes für die Infektion geklärt werden. Sorten mit unterschiedlicher Anfälligkeit wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanzen entweder mit einer Konidien-suspension oder mit den Askosporen des Pilzes inokuliert (Inokulationsverfahren C). In den Kontrollvarianten erhielten einige Pflanzen auf Grund ihres schlechten Zustandes die Boniturnote 2. Ursache hierfür war ein z.T. starker Mehltaubefall, der die Auswertung erschwerte. Latenter *Colletotrichum*-Befall wurde nicht nachgewiesen.

Aus den Abbildungen zur Krankheitsentwicklung an Jungpflanzen in Multitopfpaletten und an älteren, getopferten Pflanzen (Abb. 6 und 7) ist ersichtlich, dass Askosporen des Pilzes in weitaus geringerem Maße Infektionen verursachen als Konidien. Je zeitiger die Inokulation im Entwicklungsstadium der Pflanzen erfolgt, um so anfälliger erweisen sich diese.

Vorkommen des Erregers am Samen

Eine primäre Infektionsquelle für das Auftreten der Johanniskrautwelke ist das Saatgut. Nachfolgend soll lediglich die Situation in der Praxis bezüglich der Infektion von Saatgut aufgezeigt werden, wie sie sich in den Jahren 1998/1999 darstellte. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Saatgut, das für die Aussaat und Anzucht von Pflanzen für Anbaubetriebe in den Jahren 1998/99 verwendet wurde. Von den insgesamt 92 untersuchten Saatgutproben waren ca. 30% der Proben mit *Colletotrichum* infiziert (Abb. 8). Von den befallenen Saatgutproben wurde etwa für die Hälfte der Proben ein Befall des Saatgutes von mehr als ein Prozent ermittelt, d. h. an einem von 100 untersuchten Samen war *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* im Agarplattentest (GÄRBER, 2001) nachweisbar.

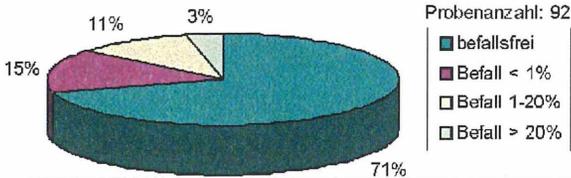


Abb. 8: Anteil befallener Saatgutproben mit *Colletotrichum cf. gloeosporioides* – Befallssituation in der Praxis 1998/1999

Fig. 8: Portion of seed samples infested with *Colletotrichum cf. gloeosporioides* – practical situation of infestation in 1998/1999

Die stark befallenen Saatgutchargen wurden hauptsächlich im Jahr 1998 ermittelt. Von dieser Befallssituation ausgehend musste in den betroffenen Jungpflanzenbetrieben mit starken Ausfällen gerechnet werden.

Diese Situation war Ausgangspunkt für umfangreiche Untersuchungen zur Samenbürtigkeit des Erregers und zur Aufklärung des Infektionszyklus.

Diskussion

Der Erreger der Johanniskrautwelke, *Colletotrichum cf. gloeosporioides*, stellt europaweit eine Gefahr für den Anbau von Johanniskraut dar. Davon zeugen Berichte über ein Erstauftreten des Erregers aus verschiedenen europäischen Ländern (GERLACH, 1997; SCHWARCZINGER und VAJNA, 1998,1999; GÄRBER, 1999; DEBRUNNER et al., 2000; MIKOLAJEWICZ und FILODA, 1999). Der Erreger zeichnet sich durch eine hohe Wirtsspezifität und Aggressivität aus. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Pathotests mit *Colletotrichum*- und *Glomerella*-Isolaten verschiedener Wirtspflanzenherkünfte untermauern die Erkenntnis, dass es sich bei *Colletotrichum* an Johanniskraut um einen auf die Wirtspflanze spezialisierten Erreger handelt. Andererseits ist noch nicht eindeutig geklärt, inwieweit Pflanzen der Familie der Nachtschattengewächse durch den Erreger infiziert werden können und welche Bedeutung diese für die Übertragung oder Überdauerung des Erregers einnehmen. Im Infektionsversuch konnte zwar der Erreger an Kartoffel nachgewiesen werden, die Bedeutung der Kulturart in der Fruchtfolge als potentielle Krankheitsgefahr kann jedoch aus diesen Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Der Erreger ist hochvirulent an Johanniskraut und vermag die Pflanze in verschiedenen Entwicklungsstadien zu befallen. Im Keimlings- und Jungpflanzenstadium reagieren die Pflanzen stark anfällig. Die Konidien, die sich rasch bei feuchtem Mikroklima im Bestand verbreiten, können schon bei geringer Inokulumdichte (10^2) an den Jungpflanzen stärkeren Krankheitsbefall bzw. Pflanzenausfälle verursachen. Zwischen den Sorten von Johanniskraut wurden Unterschiede in der Anfälligkeit für die Welkekrankheit ermittelt.

Da *Colletotrichum cf. gloeosporioides* in vitro sehr schnell beide Fruchtformen bildet, sollte im Pflanzentest die Infektiosität der Konidien und Askosporen des Pilzes vergleichend getestet werden. Zur Bedeutung der verschiedenen Fruchtformen für die Infektion wird aus den vorliegenden Untersuchungen im Wesentlichen abgeleitet:

1. Die Konidien des Erregers infizieren die Pflanze in verschiedenen Entwicklungsstadien in starkem Maße und sind für die Verbreitung der Krankheit im Pflanzenbestand von großer Bedeutung.
2. Askosporen scheinen in erster Linie für die Überdauerung des Erregers von wesentlicher Bedeutung zu sein.

Mit den Untersuchungen zum Infektionsverlauf bei Anwendung verschiedener Inokulationsverfahren, unter Berücksichtigung unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Pflanze und Inokulumdichten wurden wichtige methodische Grundlagen für die Erarbeitung einer Resistenzprüfmethode geschaffen. Die züchterischen Bemühungen, dem Anbauer ertragssichere und leistungsfähige Sorten mit einer hoher Widerstandsfähigkeit gegenüber der Johanniskrautwelke zur Verfügung zu stellen, sind außerordentlich groß. Die Züchtung resistenter Sorten für den Johanniskrautanbau findet große Beachtung, da die Johanniskrautwelke mit chemischen Pflanzenschutzmitteln schwer bekämpfbar ist (SCHMATZ und DICK, 1998) und auch die Zulassungssituation im Heil- und Gewürzpflanzenbereich äußerst schwierig ist (HEROLD, 1999).

Danksagung

Die Arbeit wurde gefördert durch die Lichtwer Pharma AG, Martin Bauer GmbH & Co. KG und Dr. W. Schwabe GmbH.

Literatur

- BOMME, U.: Kulturanleitung für Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). Merkblätter für Pflanzenbau, Heil- und Gewürzpflanzen 32, 05/86, Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Freysing 1986.
- DEBRUNNER, N.; N. RAUBER; A. SCHWARZ; V.V. MICHEL: First report of St. John's-wort anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Switzerland. Plant Disease 84, 203, 2000.
- GÄRBER, U.: Erste Ergebnisse von Untersuchungen zur Johanniskrautwelke. Zeitschrift für Arznei- und Gewürzpflanzen 4, 181-186, 1999.
- GERLACH, W.P.; K. MAHLER: Erste Erkenntnisse zur Welke des Johanniskrautes in Thüringen. Drogenreport 10, 26, 1997.
- HEROLD, H.: Lückenindikation in Arznei- und Gewürzpflanzen – spezielles Problem? Gemüse 35, 183-184, 1999.
- HOPPE, B.: Entwicklung des deutschen Arznei- und Gewürzpflanzenbaus. Gemüse 36, 31-32, 2000.

MIKOLAJEWICZ, M.; G. FILODA: A threat to crops of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by fungal pathogens. *Progress in Plant Protection*, 39, 835-837, 1999.

SCHMATZ, R.; C. DICK: Erfahrungen zum Auftreten und zur Bekämpfung der Johanniskraut-Rotwelke (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Thüringen. *Drogenreport* 11, 16-19, 1998.

SCHWARCZINGER, I.; L. VAJNA: First report of *Hypericum perforatum* (St. John's-Wort) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Novenyvedelem*, 35, 317-319, 1999.

(Manuskript eingelangt am 12. Dezember 2001, angenommen am 9. Jänner 2002)

Untersuchungen über das Auftreten und die Prognose der Kohldrehherzmücke (*Contarinia nasturtii* Kieffer) an Brokkoli in der Vorderpfalz

Investigations on the distribution of the swede midge (*Contarinia nasturtii* Kieffer) in the palatinate and control of the first generation via a temperature model

INGEBORG KOCH ¹⁾ & A. GEMMAR ²⁾

¹⁾ Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstrasse

²⁾ Fachhochschule Geisenheim, Gartenbau & Landespflege, Von-Lade-Str. 1, 65366 Geisenheim

Zusammenfassung

In zweijährigen Untersuchungen wurde das Auftreten der Kohldrehherzmücke (*Contarinia nasturtii*) in der Vorderpfalz beobachtet und die Bekämpfung der ersten Generation anhand eines Temperatursummenmodells überprüft. Dabei konnten im räumlichen Auftreten Unterschiede aufgezeigt werden. Die Verteilung im Bestand konnte an der geographischen Lage als auch an der Fruchtfolge festgemacht werden. Anhand eines von NOLL (1959) entwickelten Temperatursummenmodells kann das Erstauftreten des Schädlings recht termingenau vorhergesagt werden und somit eine gezielte Bekämpfung der ersten Generation erfolgen.

Stichwörter: Kohldrehherzmücke, *Contarinia nasturtii*, Vorderpfalz, Temperatursummenmodell, räumliches Auftreten, Verteilung im Bestand, Erstauftreten, Bekämpfung

Summary

Regional appearance of the swede midge (*Contarinia nasturtii*) in the vegetable production area of the palatinate was observed during two years. Control of the first generation by using a temperature model by NOLL (1959) was investigated. There are differences in the regional appearance and distribution in the field. Via the temperature model it is possible to determine the first appearance of the insect almost exactly. By controlling the first generation further generations cannot develop extremely.

Key words: swede midge, *Contarinia nasturtii*, Palatinate, temperature model, regional appearance, distribution in the field, first appearance, control

Einleitung

Im Gemüseanbaugebiet Vorderpfalz wird auf einer Fläche von 420 Hektar Brokkoli angebaut. Dies entspricht einer Pflanzenmenge von etwa 16 Millionen. 75 Prozent der Anbaufläche befinden sich im Großraum Frankenthal. Seit einigen Jahren wird dort von zunehmenden Problemen mit dem Schädling Kohldrehherzmücke (*Contarinia nasturtii*) an Brokkoli berichtet. Dieses Tier legt seine Eier in die Nähe des Vegetationspunktes der Pflanze. Die daraus schlüpfenden Larven schädigen durch Fraß. Schwere Wachstumsstörungen der Pflanze sind die Folge. Dadurch kann es zu starken Ausfällen bis hin zum Totalausfall einzelner Sätze kommen.

Trotz intensiver, vorbeugender Behandlung mit Insektiziden kommt es aufgrund der versteckten Lebensweise des Tieres zu starken Schäden. Verstärkt wird diese Problematik durch die, bedingt durch die Nivellierung des Pflanzenschutzgesetzes, stark eingeschränkte Mittelverfügbarkeit. Es stehen keine Mittel mit systemischer Wirkung zur Verfügung, so dass eine erfolgreiche Bekämpfung nur durch genaue Terminierung der Bekämpfungsmaßnahmen möglich ist. Für die Betriebe ist die Feststellung dieser Termine durch die geringe Größe des Schädlings jedoch nicht möglich.

Material und Methoden

Um eine gezielte Bekämpfung zu ermöglichen, ist es von großer Bedeutung, das Auftreten der ersten Generation vorherzusagen. In den Niederlanden wird zu diesem Zweck ein Prognosemodell recht erfolgreich angewendet, das auf Untersuchungen von NOLL et al. (1942) und NOLL (1959) zurückgeht (CONTARPÉ, BOUMA 1996). Es basiert auf der Summierung der Tagesdurchschnittswerte der Bodentemperatur in 5 cm Tiefe. Um das witterungsgestützte Modell anwenden zu können, ist es jedoch nötig, Befallslagen zu kennen.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten das Ziel das regional unterschiedliche Auftreten des Schädlings zu erfassen sowie eine Überprüfung des Prognosemodells für den Raum Vorderpfalz vorzunehmen.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Biologie der Kohldrehherzmücke: Sie gehört zur Familie *Cecidomyiidae*, Unterfamilie *Cecidomyiinae*, Gattung *Contarinia*, Art *Contarinia nasturtii*, erstmals beschrieben von KIEFFER (1888). Das erwachsene Tier ist etwa 1,5 mm bis 2 mm lang. Die Eier sind circa 0,3 mm lang, etwa 0,08 mm breit, wurstförmig gestreckt und leicht gekrümmt. Das Weibchen legt die Eier in Gelegen von etwa 8 – 20 Stück tief zwischen die Blattstiele der jüngeren Herzblätter. Man kann an einer Pflanze bei starkem Befall mehrere Eigelege finden (bis zu 100 Eier). Das Weibchen kann insgesamt bis zu 200 Eier ablegen.

Die Larven sind weißlich bis schwach gelblich gefärbt, manchmal auch tiefgelb. Sie werden etwas über 2 mm lang. Die Larven können mehrere Zentimeter weit springen (UNRUH 1974). Nach Abschluss ihrer Entwicklung begeben sich die Larven in die Erde, wo sie sich in einen mit kleinsten Erdteilchen durchsetzten, etwa 2 mm großen Kokon einspinnen (NOLL et al. 1942), der durch die anhaftenden Erdteilchen kaum vom Erdreich zu unterscheiden ist.

Die Kohldrehherzmücke überwintert als Larve im Boden in geringer Tiefe (circa 2 – 7 cm (SCHRAMMEYER 2001)). Nach erfolgter Verpuppung wandert die Puppe zur Erdoberfläche (NOLL et al. 1942), dort erfolgt der Schlupf der Mücken. Dazu ist jedoch eine ausreichende Bodenfeuchtigkeit und eine Bodentemperatur von mehr als 15 °C nötig. Bei großer Trockenheit im Boden ($pF > 3,4$) verbleibt die Larve in der Ruhephase, ohne sich zu verpuppen, auf diese Weise können sie mehr als 12 Monate überdauern (Überliegen). Bei genügender Bodenfeuchte endet diese Ruhephase und die Larve verlässt den Kokon, bewegt sich zur Erdoberfläche und verpuppt sich dort erneut, um schließlich zu schlüpfen (READSHAW 1966).

Die Lebensdauer der adulten Tiere beträgt bei 20 °C etwa 4 – 5 Tage (NOLL et al. 1942). Sie halten sich vor allem zwischen den äußeren Herzblättern auf (UNRUH 1974). Zur Eiablage werden windgeschützte Standorte bevorzugt. Das Weibchen beginnt damit schon 1 – 2 Stunden nach der Paarung, meist an Gruppen benachbarter Pflanzen (READSHAW 1966).

Die Eiablage erfolgt in einem Temperaturbereich von 16 – 26 °C (STOKES 1953, zitiert in: NOLL 1959), wobei das Temperaturoptimum bei 20 – 22 °C liegt. Die Entwicklungszeit der Eier beträgt bei 20 °C 4 – 5 Tage, bei 15 °C etwa 9 Tage (NOLL et al. 1942). Die Larven leben gesellig (2 – 40 pro Pflanze (SCHRAMMEYER 2001)) und fressen an der Oberfläche der Blattstiele in den Blattachseln. Mit Hilfe von Speicheldrüsen produzieren sie ein Sekret, das die Kutikula auflöst und die Zellen der Blattoberfläche verflüssigt. Während der Fraßperiode sind sie in eine Flüssigkeit eingebettet, die aus Zellinhalten, Speichelsekret und Ausscheidungsprodukten besteht (READSHAW 1966). Die Entwicklungszeit der Larven liegt bei circa 8 – 14 Tagen, in Abhängigkeit von der Temperatur. Nach Abschluss ihrer Entwicklung wandern sie zur Verpuppung in den Boden. Dies geschieht ausschließlich nachts (BAUR 2001) und bei hoher Luftfeuchte (LEGRAND 2001). Nach etwa 10 – 20 Tagen schlüpfen die Mücken der nächsten Generation (SCHRAMMEYER 2001).

Der Schaden entsteht durch die Einwirkung der Kohldrehherzmückenlarven auf die jüngsten Pflanzenteile. Die Larven ernähren sich durch oberflächlichen Schabefraß (BEDLAN et al. 1992). An den Fraßstellen kommt es zur Einkrümmung des Blattstiels, auf der gegenüberliegenden Seite entsteht eine Verdickung. Es kommt zu Verdrehungen des Blattes. An den befallenen Stellen entstehen Verkorkungen, diese werden aber erst nach einigen Tagen sichtbar (UNRUH 1974). Bei starkem Befall wird oft der Vegetationspunkt vollständig zerstört (Herzlosigkeit). Anfällig sind Pflanzen jeden Alters. Bei später Eiablage wird die Blume geschädigt und ist durch Verkrüppelungen und Laubdurchwuchs nicht zu vermarkten (LEGRAND 2001).

Zu den Wirtspflanzen gehören Kohlarten, Kohlrüben, Speiserüben, Radies, Rettich, Raps, Rübsen, Senf, Kresse, Markstammkohl sowie kreuzblütige Unkräuter. Nach bisherigen Erfahrungen scheint Brokkoli besonders bevorzugt zu werden. Zu prüfen ist noch, ob Sortenunterschiede bezüglich der Anfälligkeit bestehen. Hierzu gibt es Angaben aus der Schweiz (BAUR 2001), wonach z.B. die Sorte ‚Marathon‘ besonders anfällig ist. Diese wird im Anbaugbiet Vorderpfalz als Standardsorte angebaut.

Von einer Einschleppung des Schädling, etwa durch verseuchte Jungpflanzen, ist nicht auszugehen, denn nach NOLL et al. (1942) gab es schon 1912 Schäden durch die Dreh-

herzmücke an Kopfkohl in Kandel (Pfalz). Wahrscheinlicher ist, dass das stärkere Auftreten des Schädlings in engem Zusammenhang mit der Steigerung des Kohlanbaues steht (Verdopplung des Anbaus in den letzten 10 Jahren von 220 auf 420 Hektar). Weitere Gründe für eine Zunahme des Schädlings könnten eine enge Fruchtfolge und mangelnde Feldhygiene sein. Zum Teil werden im Untersuchungsgebiet zwei Sätze Brokoli pro Jahr auf dieselbe Fläche gepflanzt.

Im Jahr 2000 wurde mit der systematischen Erfassung der Befallsflächen begonnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, dass sich die Tiere durch optische Kontrolle anhand der Fühlergliederung und der Flügelstruktur unter dem Binokular bestimmen lassen. Zur sicheren Bestimmung der Kohldrehherzmücke eignet sich nach SCHRAMEYER (2001) die Kontrolle der Triebspitzen auf abgelegte Eier bzw. dort befindliche Larven. Die Bestimmung der Mücken durch optische Kontrolle unter Zuhilfenahme von Gelbschalen ist ungeeignet, denn es bestehen Verwechslungsmöglichkeiten mit Kohlschotenmücke (*Dasineura brassicae*), Weizengallmücke (*Contarinia tritici*), Erbsengallmücke (*C. pisi*) oder Luzerneblütengallmücke (*C. medicaginis*).

Obwohl die Triebspitzenkontrolle sehr aufwendig ist, kann mit ihrer Hilfe ein Befall sehr sicher diagnostiziert werden. Die Untersuchungen fanden auf insgesamt 18 Standorten in der Zeit vom 2. Mai bis 4. Oktober 2001 statt. Es wurden zweimal wöchentlich Triebspitzen von je 20 Pflanzen eines Standortes entnommen und möglichst noch am selben Tag unter dem Binokular auf Eiablage und Larvenbesatz untersucht. Als Schadschwelle nennt SCHRAMEYER (2001) ein Eigelege an 20 untersuchten Pflanzen.

Das Untersuchungsgebiet befindet sich im Anbaubereich Vorderpfalz und erstreckt sich vom Rhein in Höhe Ludwigshafen westwärts bis zu einer Linie Dirmstein – Maxdorf. Dabei reicht die Ausdehnung im Norden bis Bobenheim-Roxheim, im Süden bis zur A 650. Der Schwerpunkt der untersuchten Flächen lag im Raum Frankenthal (Mörsch, Ormsheimer Hof) sowie in der Gemarkung Dirmstein. Das Gebiet ist gekennzeichnet durch eine Jahresdurchschnittstemperatur von 10,3 °C und einen Jahresniederschlag von etwa 580 mm. Aufgrund der relativ geringen Niederschläge ist eine Feldberegnung, mittels Rohrberegnung oder Beregnungsmaschinen, notwendig und auch allgemein üblich.

In der Vorderpfalz trat die Kohldrehherzmücke im Jahr 2001 von Anfang Mai (auf verfrühten Flächen), bzw. Mitte Mai (unverfrühte Flächen) bis Oktober in fünf Generationen auf, dabei verlief das Auftreten der einzelnen Generationen sowohl in klar abgegrenzten Phasen als auch stark überlappend, verursacht durch Überliegen der Larven. Als Anhaltspunkt nennt SCHLAGHECKEN (2001) den Beginn der Holunderblüte als ersten Schlupftermin.

Für die Untersuchungen wurden sowohl mit Folie/Vlies verfrühte als auch unverfrühte Flächen herangezogen. Auf einigen Flächen konnte das Auftreten der Drehherzmücke über den gesamten Beobachtungszeitraum verfolgt werden, da zwei Sätze hintereinander angebaut wurden. Dies wirkte sich sicher positiv auf den Befall aus. Die Praxis, die Bestände nach der Ernte zum Teil geraume Zeit stehen zu lassen, verstärkt diesen Effekt. Es wurden auf 17 von 18 untersuchten Standorten Drehherzmücken gefunden, dabei befand sich das Hauptbefallsgebiet nördlich und westlich von Frankenthal-Mörsch.

Der Befall ist von Fläche zu Fläche unterschiedlich, dabei spielen die geographischen und klimatischen Verhältnisse eine Rolle. Auch innerhalb einer Fläche kann die Befallshöhe, in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, unterschiedlich sein. Besonders günstig sind windgeschützte und feuchte Lagen, an denen höherer Befall festgestellt werden konnte. Bei Anbau zweier Sätze in Folge nivelliert sich beim zweiten Satz die Befallshöhe innerhalb der Fläche durch Ausbreitung der Tiere über den Bestand. Die Drehherzmücke kann aktiv geringe Entfernungen überbrücken und damit auf benachbarte Flächen vordringen. Durch chemische Bekämpfungsmaßnahmen kann die Drehherzmückenpopulation reduziert, jedoch nicht vollständig ausgeschaltet werden. Eine zu geringe Fruchtfolge (Selbstfolge) und schlechte Feldhygiene (Nichtbeseitigen abgeernteter Bestände) wirken sich befallssteigernd aus.

Wie bereits erwähnt, kommt der Bestimmung des ersten Schlupftermins der Kohldrehherzmücke größte Bedeutung zu. Nur wenn dieser bekannt ist, kann eine effektive Bekämpfung der ersten Generation vorgenommen werden. Diese sorgt gleichzeitig indirekt für eine Populationsverringering der nachfolgenden Generationen.

Die überwinternde Drehherzmückenlarve beendet ihre Diapause, wenn im Frühjahr die Bodentemperatur erstmals über 21 °C steigt und an den darauffolgenden Tagen etwa 20 mm Niederschlag fallen. Die Entwicklung wird durch die starke Wasseraufnahme ange-regt, die Temperaturerhöhung allein genügt jedoch nicht (NOLL 1959). Nach der Einwirkung einer bestimmten Temperatursumme ist die Entwicklung abgeschlossen und die Mücke kann ausschlüpfen. Der Faktor Niederschlag kann bei den vorliegenden Untersuchungen vernachlässigt werden, da die untersuchten Flächen regelmäßig bewässert werden.

Die Grundlage zur Berechnung der Temperatursumme bildet die verbesserte Temperatursummenregel nach BLUNCK (1923). Die Temperatursumme (C) ist das Produkt aus Zeit (t) in Tagen und mittlerer Tagestemperatur (T) in °C, gemessen in 5 cm Bodentiefe, (= t * T), vermindert um das Produkt aus Zeit (t) und Schwellenwert (T₀). T₀ bezeichnet den Entwicklungsnullpunkt, unterhalb dieser Temperatur findet keine Entwicklung der Puppe statt). $C = t * (T - T_0)$

In den Jahren 1955 und 1957 konnte NOLL (1959) durch umfangreiche Versuche mit Drehherzmückenzuchten als Schwellenwert (T₀) 7,2 °C ± 0,09 und als Konstante (C) 160 ± 0,6 bestimmen.

Die Messung erfolgt nach folgendem Prinzip: Steigt die absolute Temperatur in 5 cm Bodentiefe zum ersten Mal über 21 °C (für etwa 1 – 2 Stunden), beendet die Larve ihre Diapause und beginnt mit der Verpuppung. Der darauffolgende Tag markiert den Anfangspunkt der Messung. Am 1. Mai 2001 lag die Temperatur mit 20,7 °C zwar geringfügig unter dem Grenzwert, wurde jedoch als ausreichend betrachtet. Die Summierung begann einen Tag später, am 2. Mai. Durch Addition der Tagesdurchschnittstemperaturen in 5 cm Bodentiefe wird die Wärmesumme ermittelt. Dabei wird von jedem Summenbestandteil der Schwellenwert T₀ subtrahiert. Dies wird solange fortgesetzt, bis der C-Wert erreicht ist.

Beispiel:	Tag 1	$\emptyset - \text{Temp. } 12,2 - 7,2 = 5$	Summe = 5
	Tag 2	$\emptyset - \text{Temp. } 14,3 - 7,2 = 7,1$	Summe = 12,1
	Tag 3	$\emptyset - \text{Temp. } 16,5 - 7,2 = 9,3$	Summe = 21,4 usw.

Mit Hilfe des Prognosemodells konnte das Erscheinen der ersten Generation auf unverfrühten Flächen mit einer Genauigkeit von 2 – 3 Tagen vorhergesagt werden. Als erster Schlupftermin wurde der 17. Mai berechnet. Die durchschnittliche Temperatur innerhalb des Zeitraums betrug 17,5 °C (mittlere wirksame Temperatur 10,3 °C). Die aufgrund dieser Temperatur berechnete Entwicklungsdauer liegt bei 16 Tagen. Damit stimmt sie sehr gut mit den Versuchsergebnissen von NOLL (1959) überein.

Zur Vorhersage des Schlupfes der ersten Generation auf mit Vlies/Folie verfrühten Flächen ist die Messung der Bodentemperaturwerte unter der Abdeckung nötig, da dort die Werte höher liegen. Auf solchen Flächen erschienen die Mücken bis zu zwei Wochen früher als auf unverfrühten Flächen.

Zur Berechnung des Schlupftermins wurden Wetterdaten der Station Kleinniedesheim des Agrarmeteorologischen Messnetzes Rheinland-Pfalz verwendet. Die Wetterstation liegt etwa 5 km nordwestlich von Frankenthal auf einer Höhe von 105 m über Normalnull.

Um einen Anhaltspunkt zu erhalten, ob die verwendeten Wetterdaten zur Berechnung des Schlupftermins herangezogen werden können, wurde im Untersuchungsgebiet in der Zeit vom 15. Juni bis zum 20. September 2001 eine Vergleichstemperaturmessung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten tendenziell mit den Wetterdaten der Wetterstation Kleinniedesheim überein, mit einigen Abweichungen nach unten, bedingt durch den nicht repräsentativen Standort des Temperatursensors.

Literatur

- BAUR, Robert: Persönliche Mitteilung, 10. Juli, FAW Wädenswil, 2001.
- BEDLAN, G., KAHRER, A., SCHÖNBECK, H.: Wichtige Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau, Bundesanstalt für Pflanzenschutz, Wien, S. 66 – 68, 1992.
- BLUNCK, H.: Die Entwicklung des *Dytiscus marginalis* L. vom Ei bis zur Imago. 2. Teil, Z. wiss. Zool., 121, S. 76 – 151, 171 – 391, 1923.
- BOUMA, E.: CONTAPRÉ, prototype of a model for prediction of emerging of the swede midge (*Contarinia nasturtii*), Proceedings of the workshop on decision systems in crop protection, Münster, S. 25 – 30, 1996.
- FRÖHLICH, G.: Gallmücken, Schädlinge unserer Kulturpflanzen, Die neue Brehm-Bücherei, 253, Lutherstadt Wittenberg, S. 1 – 80, 1960.
- KIEFFER, J. J.: Beiträge zur Kenntnis der Gallmücken, Ent. Nachr., 14, S. 262 – 268, 1988.
- LEGRAND, Patrick : Swede midge, HYPPZ Database, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, 2001.
<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6connas.htm>

NOLL, J.: Über den Einfluss von Temperatur und Bodenfeuchtigkeit auf die Larven und Puppen der Kohldrehherzmücke (*Contarinia nasturtii* Kieffer) als Grundlage für die Vorausberechnung des ersten Schlüpftermins im Frühjahr, Archiv für Gartenbau, 7, S. 362 – 415, 1959.

NOLL, J., ROESLER, R., BENNER, J.: Die Drehherzmücke (*Contarinia nasturtii* Kieffer), ihre Biologie und Bekämpfung, Arb. physiol. angew. Ent. Berlin-Dahlem, Band 9, Nr.1, S. 1 – 45, 1942.

READSHAW, J. L.: The ecology of the swede midge, *Contarinia nasturtii* (Kieffer) (Diptera, Cecidomyiidae). I. – Life-history and influence of temperature and moisture on development, Bull. Ent. Res., 56 (4), S. 685 – 700, 1966.

SCHLAGHECKEN, Josef: Persönliche Mitteilung, 26. April, SLFA Neustadt/Weinstr.2001

SCHRAMEYER, Klaus: Vortrag, 06. Februar, SLFA Neustadt/Weinstr., 2001.

UNRUH, Martin: Anleitung für die Beobachter des Pflanzenschutzwarndienstes, Kohldrehherzmücke, Landwirtschaftskammer Rheinland, S. 81 – 83, 1974.

(Manuskript eingelangt am 17. Dezember 2001, angenommen am 15. Jänner 2002)

Pflanzenschutzberichte
Band 60, Heft 1, 2002
ISSN 0031-675X

Resistenz gegen das Kohlschwarzringflecken-Virus (*Turnip mosaic virus*) in *Brassica oleracea*-Primitivformen

Resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica oleracea* primitive forms

REINER KRÄMER, FRANK MARTHE, EVELYN KLOCKE, ULRICH RYSCHKA,
EBERHARD CLAUSS & GÜNTER SCHUMANN

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für gartenbau-
liche Kulturen, Neuer Weg 22/23, D-06484 Quedlinburg

Zusammenfassung

Das *Turnip mosaic virus* (TuMV) ist ein bedeutendes Virus im Kohlanbau. Insbesondere bei Kopfkohl kann das TuMV bis zu 25 % Ertragsausfälle und durch Gewebenekrotisierungen auch Qualitätsminderungen verursachen. Eine effektive Bekämpfung der Viren mit Pflanzenschutzmitteln ist nicht möglich. Eine sinnvolle Alternative bietet hier die Verbesserung der Resistenz der Kohlpflanzen gegen das Virus. In *Brassica oleracea* L.-Primitivformen wurden neue Ressourcen mit Resistenz gegen das TuMV erschlossen. Durch sukzessive Selektion war es möglich, sieben Linien aus den *B. oleracea*-Primitivformen mit Resistenz gegen jeweils drei TuMV-Pathotypen zu entwickeln. In ersten Kreuzungen mit einer *B. oleracea*-Kulturform konnte diese Resistenz in die Nachkommenschaft (F_1) übertragen werden.

Stichwörter: *Brassica oleracea* L. -Primitivformen, Kohlschwarzringflecken-Virus (*Turnip mosaic virus*, TuMV), Evaluierung, TuMV-Resistenz.

Summary

Turnip mosaic virus (TuMV) is one of the most important pathogens in vegetable brassica crops. In white cabbage TuMV infection causes up to 25% yield losses and also necrosis during cold storage of the heads. The best way for plant protection is the establishment of resistance to different TuMV pathotypes in white cabbage (*Brassica oleracea* L.). In *B. oleracea* primitive forms there were evaluated new resources with resistance to TuMV for the first time. Seven inbred lines with resistance to three different TuMV pathotypes were developed through successive selection. The resistance was successful transferred into a *B. oleracea* culture form.

Key words: *Brassica oleracea* L. primitive forms, cabbage black ringspot virus (*Turnip mosaic virus*, TuMV), evaluation, TuMV resistance.

Einleitung

Das Kohlschwarzringflecken-Virus (*Turnip mosaic virus*, TuMV) gehört zu den bedeutendsten Pathogenen an Gemüse-*Brassica*. Die potentielle Schädigung des TuMV an Kohl (*Brassica oleracea* L.) resultiert aus der Anfälligkeit aktueller Kohlsorten (KRÄMER ET AL., 1995), einem außerordentlich großen Wirtspflanzenkreis (EDWARDSON & CHRISTIE, 1991) in Verbindung mit einer Ausweitung des Rapsanbaues sowie dem Auftreten unterschiedlicher TuMV-Pathotypen (JENNER & WALSH, 1996). Beim Weißkohl (*B. oleracea* L. var. *capitata*) kann das TuMV bis zu 25 % Ertragsverlust hervorrufen, sowie stark qualitätsmindernde Gewebenekrotisierungen insbesondere beim Lagerkohl bewirken (GLAESER, 1970; WALKEY & WEBB, 1978; WALKEY & PINK, 1988; PINK & WALKEY, 1990; KRÄMER, ET AL., 2000a, b).

Eine effektive Bekämpfung des TuMV mit Pflanzenschutzmitteln ist nicht möglich. Darüber hinaus ist die Applikation von Insektiziden zur Unterdrückung der Vektoren kostenaufwendig und belastet Kohlgemüse und Umwelt gleichermaßen. Das sind Gründe, um nach einer nachhaltigen Alternative zu suchen. Diese liegt in der Verbesserung der TuMV-Resistenz des Kopfkohls durch Etablierung von Resistenz gegen unterschiedliche TuMV-Pathotypen. Vor diesem Hintergrund wurde nach neuen resistenzgenetischen Ressourcen in *B. oleracea*-Primitivformen gesucht. In einem Screening- und Selektionsprogramm wurden Linien aus *B. oleracea*-Primitivformen mit Resistenz gegen jeweils 3 TuMV-Pathotypen entwickelt. In ersten Kreuzungsschritten wurde damit begonnen, diese Resistenz in eine *B. oleracea*-Kulturform zu übertragen (KRÄMER ET AL. 2000a).

Material und Methoden

Pflanzenanzucht

In die Evaluierungen auf TuMV-Resistenz wurden insgesamt 6 Herkünfte von *B. oleracea*-Primitivformen einbezogen. Diese Primitivformen stammten von Madeira sowie von der Kanarischen Insel Teneriffa. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Gewächshausbedingungen in Topferde bestehend aus 50 % Torf, 35 % granuliertem Vulkanton und 15 % Rindenumus.

Virusisolate

Die einzelnen TuMV-Isolate wurden auf Chinakohl 'Asko' (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Hanelt) erhalten und vermehrt. Die Pathotypisierung von TuMV-Isolaten mit vier *B. napus*-Differentiallinien (*B. napus* L. var. *oleifera* Del.; *B. napus* L. var. *napobrassica* (L.) Rchb.) sowie eine Erweiterung des TuMV-Isolatespektrums, um die für den europäischen Raum relevanten Pathotypen, erfolgte in Zusammenarbeit mit WALSH, J. und JENNER, C. (Horticultural Research Institute Wellesbourne, Großbritannien). In den Resistenzprüfungen wurden bis zu 8 TuMV-Isolate, die 6 Pathotypen repräsentieren, als Einzelisolate und in 2 Isolatgemischen (Mix 1 und 2) eingesetzt (Tabelle 1).

Tab. 1: *Turnip mosaic virus*-Isolate und Isolatgemische (Mix 1; 2) für die Resistenzprüfungen

Tab. 1: *Turnip mosaic virus* isolates and mixture land 2 for resistance screenings

TuMV-Isolate		Pathotypen	Herkunft	
Mix 1	Mix 2	JENNER & WALSH (1996)	Wirt	Land
1	1	4**	<i>Alliaria petiolata</i>	Ungarn
2	2	4**	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Deutschland
8	8	4**	<i>Brassica napus</i>	Deutschland
14	14	6	<i>B. rapa</i> ssp. <i>oleifera</i>	Deutschland
17*	17*	1**	<i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i>	Großbritannien
	22*	5	<i>B. rapa</i> ssp. <i>napobrassica</i>	Dänemark
	23*	7	<i>Raphanus sativus</i>	Nepal
	24*	3**	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Tschechische Republik

*TuMV-Isolate von JENNER & WALSH, HRI Wellesbourne, Großbritannien

** häufigste Pathotypen, JENNER & WALSH (1996)

Virusinokulation

Das Inokulum wurde durch Mörsern infizierter Chinakohlblätter in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 (w:v, 1:10) hergestellt. Die Testpflanzen wurden dann im 3- bis 4-Blatt-Stadium mit Karborund (SiC) bestäubt und mechanisch durch Abreiben mit einem Glasspatel inokuliert (KRÄMER ET AL., 1995, 1998).

Resistenzprüfung und -bewertung

Die Resistenzprüfungen erfolgten sowohl unter Gewächshausbedingungen als auch im Frei-land. In der Regel wurden 12 Pflanzen in dreifacher Wiederholung getestet. Im Freiland wurden die Pflanzen in randomisierten Blockanlagen angebaut. Als Anfälligkeitsstandards dienten die Chinakohlsorte 'Asko' und die Weißkohlsorte 'Krautman'. Die Bonitur und der Nachweis des TuMV in den Pflanzen erfolgten 28 Tage (Gewächshaus) bzw. bis zu 150 Tage (Freiland) nach der Inokulation.

Die visuelle Symptombonitur wurde in Anlehnung an WALKEY & PINK (1988) nach einem neunstufigen Boniturschlüssel durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Viruskonzentration in den Pflanzen erfolgte mit dem Double Antibody Sandwich (DAS)-ELISA nach CLARK & ADAMS (1977). Im DAS-ELISA wurde ein polyklonales Antiserum aus dem Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik (BAZ) eingesetzt.

Zur Ermittlung der postinfektionellen Viruskonzentration wurden pro Pflanze repräsentativ von Blättern unterer, mittlerer und oberer Insertion 6 Blattscheiben mittels Korkbohrer (\varnothing 18 mm) ausgestanzt. Anhand der Extinktionswerte im DAS-ELISA wurde die Infektionsrate in Prozent (Anteil infizierter Pflanzen) ermittelt. Als infiziert wurden Pflanzen eingestuft, bei denen die Extinktionswerte im DAS-ELISA bei $E_{405nm} \geq 0,1$ lagen. Pflanzen, die keine Symptome zeigten und im DAS-ELISA negativ reagierten ($E_{405nm} < 0,1$), wurden als virusfrei klassifiziert und entsprechend selektiert.

Ergebnisse

1. TuMV-Resistenz in *Brassica oleracea*-Primitivformen

Die 6 *B. oleracea*-Primitivformen wurden gegen 8 TuMV-Isolate und 2 Isolatgemische (Mix 1 und 2) getestet. Das Reaktionsbild war entsprechend der Virulenz der unterschiedlichen TuMV-Isolate und der Herkunft der Primitivformen differenziert (Tabelle 2). Die Isolate 14 (Pathotyp 6), 17 (Pathotyp 1), 23 (Pathotyp 7) und 24 (Pathotyp 3) konnten keine bzw. nur einzelne Pflanzen infizieren (Tabelle 2). Hingegen lagen die Infektionsraten bei den Isolaten 1, 2, 8 (Pathotyp 4) sowie dem Isolat 22 (Pathotyp 5) vergleichsweise hoch (Tabelle 2).

Tab. 2: Infektionsraten (%) in *Brassica oleracea*-Primitivformen nach Inokulation mit unterschiedlichen TuMV-Isolaten und Isolatgemischen (Mix 1 und 2)

Tab. 2: Infection rate (%) in *Brassica oleracea* primitive forms after inoculation with different TuMV isolates and mixture 1 and 2

<i>Brassica oleracea</i> - Primitivform	TuMV-Isolate Infektionsraten (%)									
	1	2	8	14	17	22	23	24	Mix 1	Mix 2
A 138/1*	10	0	0	0	0	n.g.	n.g.	n.g.	0	n.g.
A 140*	60	0	0	0	0	0	0	0	10	20
A 141* gelb blühend	90	20	50	0	0	20	0	0	70	50
A 141* weiß blühend	60	60	90	0	10	70	0	10	75	55
A141/1*	60	60	90	0	10	70	0	10	25	30
A 201**	30	100	10	0	10	50	10	10	10	0

*) Herkunft Madeira, **) Herkunft Teneriffa; n.g. – nicht geprüft;

2. Entwicklung TuMV-resistenter Linien in *Brassica oleracea*-Primitivformen

In den Herkünften A138/1 und 141/1 wurden virusfreie Einzelpflanzen (symptomlos, DAS-ELISA negativ) gegen TuMV-Mix 1 (Tabelle 1) selektiert. Durch sukzessive Selektions- und Selbstungsschritte über 4 Generationen konnten insgesamt 4 (A 141/1) bzw. 3 (A 138/1) Linien mit Resistenz gegen TuMV-Mix 1 entwickelt werden (Abbildung 1).

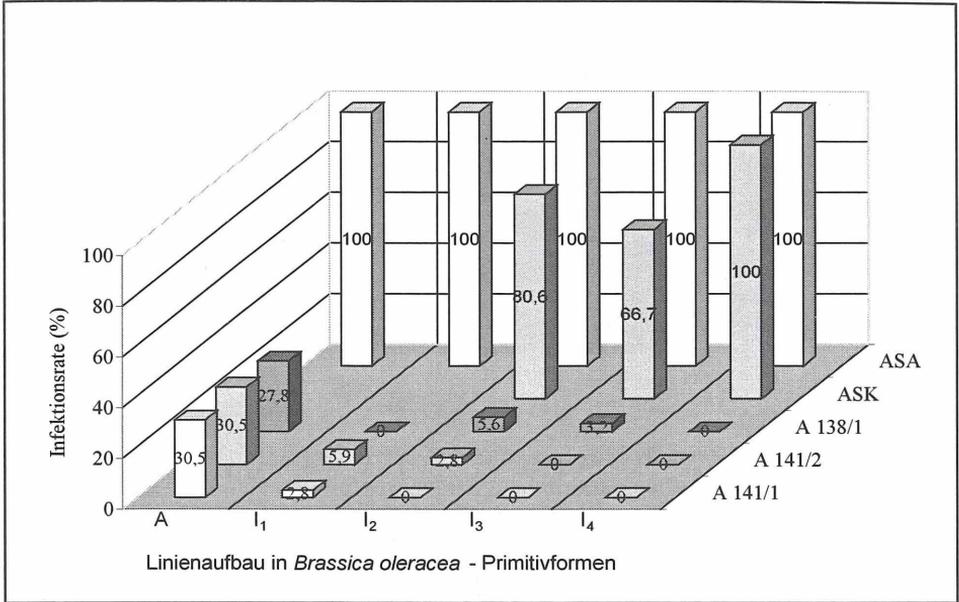


Abb. 1: Aufbau von Linien aus den *B. oleracea*-Primitivformen A 138/1 und A 141/1 mit Resistenz gegen TuMV-Mix 1, ASA: Anfälligkeitsstandard Chinakohl 'Asko', ASK Anfälligkeitsstandard Weißkohl 'Krautman', A: Ausgangsmaterial der *B. oleracea*-Primitivformen, I: Inzuchtlinien 1. bis 4. Generation

Abb. 1: Development of lines from *B. oleracea* primitive forms A 138/1 and A 141/1 with resistance to TuMV mixture 1, ASA: susceptible reference Chinese cabbage cv. Asko, ASK susceptible reference white cabbage cv. Krautman, A: original *B. oleracea*-primitive forms, I: inbred lines 1. to 4. generation

3. Stabilität von TuMV-Resistenz in Linien der *Brassica oleracea*-Primitivformen

Zum Vergleich der Resistenzstabilität wurden I₄-Linien der *B. oleracea*-Primitivformen an 2 Standorten (Quedlinburg und Aschersleben, Deutschland) angebaut. Am 1. Standort wurden die Pflanzen mechanisch mit TuMV-Mix 1 inokuliert und am 2. Standort dem natürlichen Befallsdruck durch Aphiden von einem benachbarten, TuMV-infiziertem, Rapsfeld ausgesetzt. Nach mechanischer Inokulation mit TuMV-Mix 1 (Tabelle 1) blieben alle Pflanzen virusfrei (Infektionsrate 0 %). In Relation dazu lagen

bei vergleichsweise hohem Befallsdruck durch Aphiden vom Rapsfeld die Infektionsraten zwischen 0 und 28,6 % (Abbildung 2).

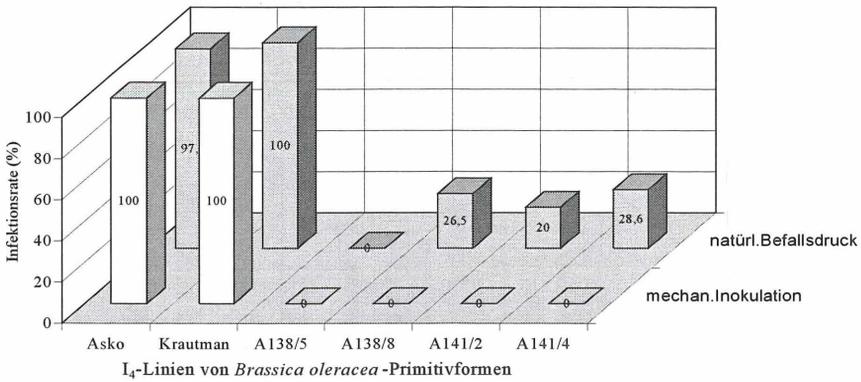


Abb. 2: TuMV-Mix1-Resistenz in I₄-Linien von *B. oleracea*-Primitivformen nach mechanischer Inokulation und bei natürlichem Blattlausbefall von einem TuMV-infizierten Rapsbestand (*B. napus* L.)

Abb. 2: Resistance to TuMV mixture 1 in lines (I₄) of *B. oleracea* primitive forms after mechanical inoculation and by natural aphid transmission from TuMV infected oilseed rape (*B. napus* L.)

4. Übertragung von TuMV-Resistenz in eine *Brassica oleracea*-Kulturform

Die Übertragung der TuMV-Resistenz aus den *B. oleracea*-Primitivformen A 138/1 und A 141/1 in eine *B. oleracea*-Kulturform erfolgte durch Kreuzung. Insgesamt wurden 17 F₁-Familien erzeugt und unter Feldbedingungen auf Resistenz gegen TuMV-Mix 1 getestet. Im Hinblick auf die TuMV-Resistenz zeigten die F₁-Hybriden von 11 Familien (64,7 %) ein uniformes Reaktionsbild (Abbildung 3). Die Pflanzen waren symptomlos und im DAS-ELISA negativ. In 6 Familien war die TuMV-Resistenzreaktion inhomogen. Die Infektionsraten lagen hier zwischen 3,3 % und 58,3 %.



Abb. 3: TuMV-Resistenz in F₁-Hybriden aus *B. oleracea*-Primitiv-form A 138/1 x *B. oleracea*-Kultur-form

Abb. 3: Resistance to TuMV in F₁ hybrids *B. oleracea* primitive form A 138/1 x *B. oleracea* culture form

Diskussion

Eine effektive und dauerhafte Kontrolle der durch das TuMV ausgelösten Kohlschwarzringfleckigkeit des Kopfkohls setzt die Verfügbarkeit von neuen genetischen Ressourcen mit Resistenz gegen unterschiedliche TuMV-Pathotypen voraus. Von Bedeutung für die Entwicklung von TuMV-resistentem Kohl ist das Auftreten von insgesamt 12 TuMV-Pathotypen, von denen 3 offensichtlich häufiger vorkommen (JENNER & WALSH, 1996). Erstmals konnte in 6 *Brassica oleracea*-Primitivformen von Madeira und der Kanarischen Insel Teneriffa Resistenz gegen 3 unterschiedliche TuMV-Pathotypen nachgewiesen werden. Das Niveau der Resistenz (Infektionsrate, Symptomstärke, relative Viruskonzentration) in den einzelnen *B. oleracea*-Primitivformen war von den TuMV-Pathotypen abhängig (Tabelle 2). So war der Anteil resistenter Pflanzen (Infektionsrate 0 %) gegen die TuMV-Isolate 1, 2 und 8 (Pathotyp 4) vergleichsweise niedriger als gegenüber den TuMV-Isolaten 14 und 17 (Pathotypen 6 und 1). Die Ursache ist in einer höheren Virulenz der Pathotyp-4-Isolate zu suchen. Das gefundene Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Resistenzuntersuchungen von JENNER & WALSH (1996) an Raps. Eine vergleichbare Virusstamm-abhängige Reaktion gegenüber 4 TuMV-Stämmen fanden WALKER & PINK (1988) in 3 Weißkohlsorten mit Resistenz gegen einen TuMV-Stamm. In der Mehrzahl sind jedoch die im Anbau befindlichen Weißkohlsorten TuMV-anfällig (POLAK, 1983, KRÄMER et al., 1995). Bisher wurden Resistenzen gegen unterschiedliche TuMV-Pathotypen nur bei Radies (*Raphanus sativus*)

vis L.) (KANEKO ET AL., 1996, KRÄMER ET AL., 1998) sowie in einigen chinesischen und japanischen Herkünften des Chinakohls (*B. rapa* ssp. *pekinensis*) nachgewiesen (PROVVIDENTI, 1980). Mit den *B. oleracea*-Primitivformen stehen zum ersten Mal Resistenzdonoren mit Resistenz gegen unterschiedliche TuMV-Pathotypen innerhalb der Art *B. oleracea* zur Verfügung. Durch die nahe Verwandtschaft der *B. oleracea*-Primitivformen zu den *B. oleracea*-Kulturformen kann der Resistenztransfer durch Kreuzung erfolgen.

Zunächst wurden Linien mit Resistenz gegen unterschiedliche TuMV-Pathotypen aus den *B. oleracea*-Primitivformen entwickelt, die dann genutzt wurden, um die Resistenz in Kopfkohl einzulagern. Ausgehend von Einzelpflanzen der Herkünfte A 138/1 und A141/1 konnten durch sukzessive Selektions- und Selbstungsschritte 7 Linien mit verbesserter Resistenz (Infektionsrate 0 %) gegenüber dem TuMV-Mix 1 (3 Pathotypen) aufgebaut werden (Abbildung 1).

Beim Anbau ausgewählter I₄-Linien der *B. oleracea*-Primitivformen an 2 Standorten mit unterschiedlichen Infektionsbedingungen, lagen die Infektionsraten in einigen I₄-Linien unter Befallsdruck mit Aphiden höher als nach mechanischer Virusinokulation (Abbildung 2). Möglicherweise war hier der Infektionsdruck durch einen permanent hohen Blattlausbefall (kein Insektizideinsatz) insgesamt zu hoch. Darüber hinaus wurden offensichtlich vom benachbarten Rapsfeld, das mit einem TuMV-Isolatgemisch infiziert worden war, auch TuMV-Isolate übertragen, gegen die nicht ausreichend Resistenz vorlag.

Die erzielten Resultate finden bei der Fortsetzung der Selektions- und Kreuzungsarbeiten zur Übertragung von TuMV-Resistenz in Kopfkohl Eingang.

Danksagung

Für die Herstellung eines polyklonalen TuMV-Antiserums danken die Autoren Herrn Dr. F. RABENSTEIN aus dem Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik (BAZ, Standort Aschersleben) ebenso wie Dr. CAROL JENNER und Dr. J. WALSH für die Pathotypisierung und Bereitstellung von TuMV-Isolaten.

Literatur

- CLARK, M. F., ADAMS, A., N.: Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-483, 1977.
- EDWARDSON, J. R., CHRISTIE, R. G.: *The Potyvirus Group*. Vol. I-IV. Florida, USA: Florida Agricultural Experiment Station Monograph 16, 1991.
- GLAESER, G.: Wodurch entstehen schwarze Stippen an Lagerkraut? *Der Pflanzenarzt*, 23. Jahrgang (Nr. 11), 122-123, 1970.
- JENNER, C. E., WALSH, J. A.: Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology* 45, 848-856, 1996.
- KANEKO, Y., NATSUAKI, T., BANG, S. W., MATSUZAWA, Y.: Identification and evaluation to turnip mosaic virus (TuMV) resistance gene in kale monosomic addition lines of radish. *Breeding Science* 16, 117-124, 1996.

- KRÄMER, R., KLOCKE, E., NEUMANN, M., RYSCHKA, U., SCHUMANN, G., CLAUSS, E., HAMMER, K.: Reaction of *Brassica* genotypes to Turnip Mosaic Potyvirus. 8th Conference of the I.S.H.S. Vegetable Virus Working Group: Advances in vegetable virus research; Prague, Czech Republic, 9-15 July 1995, Book of Abstracts, 150-153, 1995.
- KRÄMER, R., MARTHE, F., KLOCKE, E., RYSCHKA, U., SCHUMANN, G., CLAUSS, E.: Radish (*Raphanus sativus* L.) as a resistance resource to turnip mosaic virus. 9th Conference of the I.S.H.S. Vegetable Virus Working Group: Recent Advances in vegetable virus research; Turino, Italy, 22-28 August 1998, Book of Abstracts, 43-46, 1998
- KRÄMER, R., MARTHE, F., KLOCKE, E., RYSCHKA, U., SCHUMANN, G.: Etablierung und Charakterisierung von Resistenz gegen unterschiedliche *Turnip mosaic virus* (TuMV)-Pathotypen bei Gemüseformen der *Brassicaceae*, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Jahresbericht 2000, 158-160, 2000b.
- KRÄMER, R., RABENSTEIN, F., SCHUBERT, J., PROLL, E., EHRIG, F., MARTHE, F., LÖPTIEN, H.: Necrosis in stored white cabbage infected with Turnip mosaic virus (TuMV). Proceedings of the 7th Aschersleben Symposium, ‘‘New Aspects of Resistance Research on Cultivated Plants‘‘, November 17 – 18, 1999 Aschersleben, Germany, Beiträge zur Züchtungsforschung 6. Jahrgang, Heft 3, 2000, 9-14, 2000a.
- PINK, D. A. C., WALKEY, D. G. A.: Resistance to turnip mosaic virus in white cabbage. *Euphytica* 51, 101-107, 1990.
- POLAK, J.: Variability of resistance of white cabbage to turnip mosaic virus. Tätigkeitsbericht Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 216, 331-335, 1983
- PROVVIDENTI, R.: Evaluation of Chinese Cabbage Cultivars from Japan and the People’s Republic of China for Resistance to Turnip Mosaic Virus and Cauliflower Mosaic Virus. *Journal American Society Horticultural Sciences* 105 (4), 571-573, 1980.
- WALKEY, D. G. A., PINK, D. A. C.: Reactions of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) to four different strains of turnip mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, 112, 273-284, 1988.
- WALKEY, D. G. A., WEBB, M. J. W.: Internal necrosis in stored white cabbage caused by turnip mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 89, 435-441, 1978

(Manuskript eingelangt am 17. Dezember 2001, angenommen am 10. Jänner 2002)

Stressmanagement durch *Bacillus subtilis*

Stress management by *Bacillus subtilis*

BIRGIT KREBS; BIRGIT HÖDING & HELMUT JUNGE
FZB Biotechnik GmbH Berlin, Glienicke Weg 185, D-12489 Berlin

Zusammenfassung

In einem *Capsicum anuum* – Gefässversuch unter Gewächshausbedingungen zeigten sich positive Effekte einer Saatgut- bzw. Giessbehandlung bei pikierten Sämlingen mit FZB24[®] sowohl bei Kultivierung ohne als auch mit Salzstress auf den Gesundheitsstatus der Jungpflanzen und insbesondere auf den Paprikaertrag am Versuchsende nach 18 Kulturwochen. In einem anschliessenden Screening unter 35 *Bacillus* spp. wurden Salztoleranz, antifungale Aktivität und Pflanzenwachstumsförderung unter Salzstressbedingungen geprüft. Im Ergebnis der Untersuchungen sollen nun für 6 geeignete Stämme erste Schritte einer zukünftigen Entwicklung als Biofertilizer für speziell aride Klimabedingungen eingeleitet werden.

Stichwörter: Salzstress, Salztoleranz, *Bacillus*, Saatgutbehandlung, Giessbehandlung, *Capsicum anuum*, antifungale Aktivität, Pflanzenwachstumsförderung

Summary

Seed dressing or soil drenching of young seedlings of *Capsicum anuum* with FZB24[®] showed positive effects on the health of young plants and the yield after 18 weeks under normal or salt stress conditions in a greenhouse pot trial. In a following screening of 35 *Bacillus* spp. salt tolerance, antifungal activity and plant growth promotion was tested. Six strains with weak or without antifungal activity induced noticeable salt tolerance and growth promotion in a *Zea mays* test system. First steps in the development of a biofertilizer for arid climate conditions are started.

Key words: Salt stress, *Bacillus*, seed dressing, soil drenching, antifungal activity, plant growth promotion

Einleitung

Pflanzen unterliegen biotischen und abiotischen Stressfaktoren. Die Wirkung von *Bacillus subtilis* FZB24[®] gegen verschiedene Mycosen bei unterschiedlichen Kulturpflanzenarten wurde umfangreich belegt (Bochow 1992, Junge et. al 2000). Am Beispiel von Salzstress wurde nun untersucht, in welchem Maße *Bacillus subtilis* FZB24[®] in der Lage ist, die Toleranz von Kulturpflanzen gegenüber abiotischen Stressfaktoren des Pflanzenwachstums zu erhöhen.

Insbesondere in Gebieten mit aridem Klima mindern Versalzung und Wassermangel die Fähigkeit des Bodens, den Pflanzen als Standort zu dienen und hohe Pflanzenerträge zu erzeugen. Zielstellung war es, in einem Salzstress-Ertragsversuch mit *Capsicum anuum* Salzschäden und insbesondere Fruchtbildung bei Paprikapflanzen, die mit dem Pflanzenstärkungsmittel FZB24[®] behandelt wurden, zu verfolgen. Schlussfolgernd aus den dabei gewonnenen Erkenntnissen wurde anschliessend ein Screening nach neuen, das Pflanzenwachstum unter Salzstress fördernden Bakterien begonnen. Es sollte herausgefunden werden, in wieweit diese Eigenschaft unter sporenbildenden Bakterien verbreitet ist und ob es deutlich spezialisierte Stämme gibt. Spezielles Interesse gilt dabei Stämmen, die neben hoher Salztoleranz und Phytoeffektivität eine nur geringe oder keine antifungale Leistung aufweisen, um diese Stämme in eine zukünftige Entwicklung als Biofertilizer für aride Klimabedingungen einzubeziehen. Für eine Anmeldung als Biofertilizer ist eine ausgeprägte antifungale Aktivität der Bakterienstämme nicht erwünscht.

Material und Methoden

Gewächshausversuch mit *Capsicum anuum*

Es wurde ein 18-wöchiger Topfversuch mit *Capsicum anuum*, der Sorte 'Pustagold', durchgeführt. Der Versuch lief vom April bis zum September. Drei Wochen nach der Aussaat wurden die Sämlinge pikiert und nach weiteren zwei Wochen zum Versuchsansatz in die Versuchsgefäße getopft. Die Topfgröße betrug 13 cm. Es wurde humose Einheitserde des Typs ED73 verwendet. In einem Teil der Varianten erfolgte eine Salzapplikation in das Substrat mit jeweils 1,5g / Topf NaCl. Nach 14 Versuchstagen wurde der Einfluss der Versalzung auf den Gesundheitsstatus (0 = gesund, 1 = deutlich geschädigt) der Paprikajungpflanzen visuell bonitiert. Von der neunten bis zur 18. Versuchswoche erfolgte die Ernte der Paprikaschoten sowie die Erfassung der Fruchtmassen.

Bacillus subtilis Applikationen im Versuch mit *Capsicum anuum*

In dem Versuch kam das Pflanzenstärkungsmittel *Bacillus subtilis* FZB24[®] zum Einsatz, entweder zur Saatgutbeizung als FZB24[®]-Trockenbeize (TB; 0,5 g auf 500 Samen) oder unmittelbar nach dem Topfen im Gießverfahren in Form der wasserlöslichen Formulierung FZB24[®]WG (20 ml 10⁷ cfu/ml pro Topf) oder als Kombination beider Verfahren.

Bakterienstämme für das Screening

In das Screening wurden außer *Bacillus subtilis* FZB24 weitere 35 *Bacillus*-Stämme aus der FZB-Stammsammlung einbezogen. Diese Stämme stammten aus natürlichem Feldboden, gärtnerischen Substraten oder aus Komposten.

Alle in die Untersuchung einbezogenen Bakterienstämme wurde auf ihre Salztoleranz getestet. Zu diesem Zweck wurden wässrige Zellsuspensionen der Isolate auf Bakteriennähragar (DEV; Merck), dem unterschiedliche Konzentrationen NaCl zugesetzt wurden (0 ... 10 %), ausgespatelt und im Zeitraum von 72 h (30°C) ihre Wachstumsfähigkeit beurteilt. Des weiteren wurde die antifungale Aktivität der Isolate bzw. Stämme gegen die Testpilze *Alternaria radicina* und *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* ermittelt. Die Testungen erfolgten in Petrischalen nach der bei FILIPPI et al. (1984) be-

schriebenen Methode. Als „antifungal gering aktiv“ wurde ein Testbakterium bewertet, sobald ein Hemmhof zwischen diesem und dem Prüfpilz auftrat. Betrug der Hemmhof mehr als 5 mm, wurde das Bakterium als „antifungal aktiv“ bewertet.

Pflanzliches Testsystem für das Screening

Es wurde ein hydroponisches Testsystem verwendet auf der Basis von *Zea mays*. Desinfiziertes Saatgut (10% iges Calciumhypochlorit + 1% Tween 80, 25 min.) wurde 4 Tage bei 20°C im Dunkeln auf feuchtem, sterilem Filterpapier in Petrischalen vorgekeimt und anschließend wurden jeweils 15 gleichmäßig entwickelte Keimlinge pro Variante mit ihrer Radicula in den mit 15 Löchern versehenen Deckel eines Plastcontainers (Volumen 1,2 l) gefädelt. Es wurde Pflanzen-Nährlösung nach HOAGLAND (SIGMA) verwendet, der, außer in der unbehandelten Kontrollvariante, versporete Bakterienzellen in einer Konzentration von 10^6 cfu/ml zugesetzt wurden. Für jede Bakterienbehandlung einschließlich der Kontrollvariante wurden in getrennten Containern jeweils drei Salzkonzentrationsstufen des hydroponischen Kulturmediums mittels NaCl eingestellt (0 %; 0,6 %; 0,9 %). Die Kultivierung erfolgte bei ca. 25°C bzw. nachts bei 18°C im natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus. Nach 6 Tagen Kulturzeit wurden das Gesamtpflanzengewicht, die Spross- und Wurzellänge ermittelt. Die Ergebnisse wurden varianzanalytisch verrechnet und die statistischen Differenzen mittels Student-Newman-Keuls-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,5 % abgeschätzt.

Ergebnisse und Diskussion

Paprikaversuch

Das Ausmaß der Salzschädigung im Gewächshausversuch mit *Capsicum anuum* konnte durch eine Giessbehandlung mit FZB24WG[®] - und noch effektiver durch Kombination von Saatgutbeizung (FZB24TB[®]) und Giessapplikation - deutlich verringert werden (siehe Abbildung 1). Die Ernte der Paprikapflanzen erfolgte vierzehntägig von der 9. bis zur 18. Versuchswoche. Die Ergebnisse der Ertragsentwicklung (siehe Abbildungen 2 und 3) zeigen, dass die Giessbehandlung mit FZB24WG[®] sowohl in der Variante ohne Salz (T) als auch insbesondere bei Versalzung (S+T) Fruchtzahl und Fruchtgewicht erheblich gegenüber den entsprechenden Kontrollvarianten (K bzw. S+) förderte. Die Saatgutbehandlung zeigte in Verbindung mit versalzenerem Substrat (S+A) positive Effekte.

Auf nicht versalzenerem Boden (A) lagen die Ertragswerte leicht unter der Variante mit Giessbehandlung (T). Die Kombinationen von Saatgutbeize und Giessbehandlung (A+T), (S+A+T) waren entweder besser als alleinige Saatgutbehandlung (S+A) oder entsprachen ihr (A), waren aber immer schlechter als alleinige Giessbehandlung (T), (S+T). Insgesamt zeigten die durchgeführten Antagonistenapplikationen deutlich positive Effekte auf die Ertragsbildung bei Gemüsepaprika sowohl in nicht versalzenerem als auch in versalzenerem Kultursubstrat. Dabei waren Giessapplikationen zum Topfen besonders wirksam. Dieser Versuch bestätigte hiermit die bereits durch BOCHOW et al. (2000) gefundenen positiven Effekte auf das Ertragsverhalten von Paprika und Auberginen unter Salzstressbedingungen.

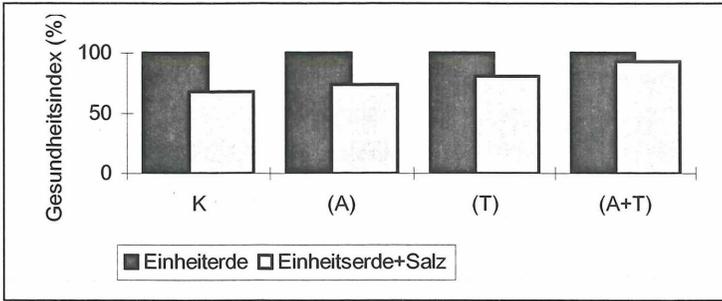


Abb. 1: Gesundheitsindex in % (visuelle Bonitur, 0 ...1) bei *Capsicum annum* 14 Tage nach dem Topfen in Einheitserde ohne / mit Salz nach Behandlung mit FZB24TB® zur Aussaat (A) oder mit FZB24WG® zum Topfen (T) oder kombiniert mit beiden Behandlungsarten (A+T)

Screening

Alle in das Screening einbezogenen 35 Bakterienstämme wiesen eine relativ hohe Salztoleranz von über 7 % auf. Etwa 43 % der Stämme waren nicht oder gering antifungal aktiv. Entsprechend der Zielstellung des Screenings wurden von diesen Stämmen 15 Kandidaten mit geringer oder fehlender antifungaler Leistung und hoher Salztoleranz für die Pflanzentestung auf der Basis von *Zea mays* ausgewählt. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der 10 Tage alten, nach Vorkeimung mit den ausgewählten Bakterien behandelten Maissämlinge dargestellt. Es wurden die Sprosslänge, Wurzellänge und das Pflanzenfrischgewicht ohne und mit Salzstress (0,6 % NaCl, 0,9 % NaCl) ermittelt und gegenüber der unbehandelten Kontrolle bewertet.

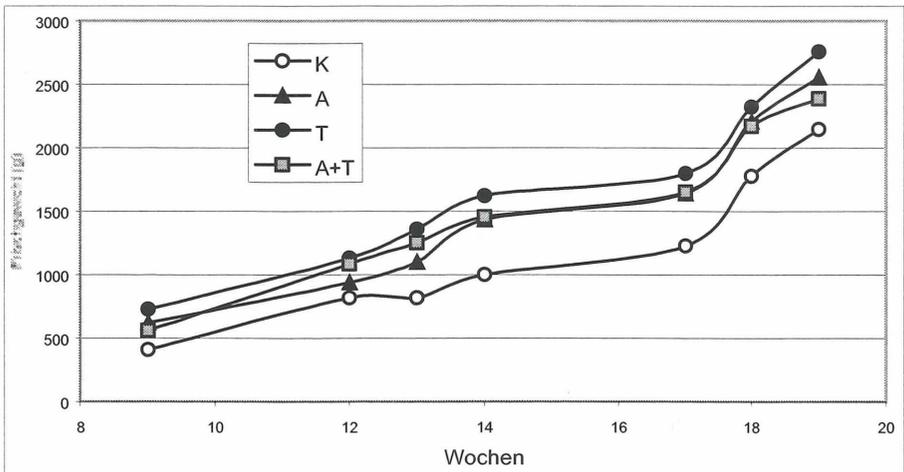


Abb.: 2

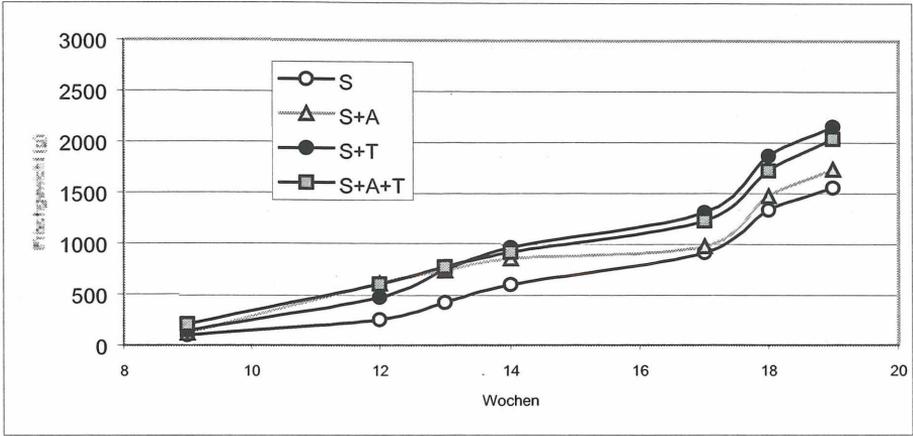


Abb.: 3

Abbildungen 2 und 3: Ernteverlauf (Fruchtfrischmasse in g) bei *Capsicum annum* durch Behandlung mit FZB24TB[®] zur Aussaat (A) oder mit FZB24WG[®] zum Topfen (T) oder kombiniert mit beiden Behandlungsarten (A+T) in Einheitserde Typ ED73 ohne Versalzung (Abbildung 2) oder mit Versalzung (Abbildung 3, S+)

Im Ergebnis der Testungen zeigte sich, dass fast alle ausgewählten Isolate in der Lage waren, die Entwicklung der Maiskeimlinge positiv zu beeinflussen. Unter den Bedingungen eines mittleren Salzstresses (0,6 % NaCl) war das aber seltener der Fall als bei höherem Salzstress (0,9 % NaCl). Neben FZB24 zeigte auch der Teststamm 10 eine durchgehend günstige Beeinflussung der Pflanzenentwicklung. Teststamm 11 steigerte bei 0 % und 0,6 % deutlich das Wachstum der Maiskeimlinge. Die Teststämme 2, 8 und 9 verbesserten ohne Salzstress und insbesondere in den Varianten mit 0,9 % NaCl das Pflanzenwachstum und der Teststamm 15 nur unter höheren Salzstressbedingungen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass das Phänomen der Pflanzenwachstumsbegünstigung unter Salzstressbedingungen möglicherweise bei *Bacillus* spp. weiter verbreitet ist. Die für einige *Bacillus*-Arten bekannte höhere Salztoleranz (SNEATH et al. 1986) könnte Ursache dafür sein, dass diese Stämme sich trotz höherer Salzkonzentrationen im Nährmedium in der Pflanzenumgebung (Rhizosphäre) etablierten und mittels spezifischer, phytoeffektiver Metabolite (DOLEJ, 1998) das Pflanzenwachstum teilweise deutlich begünstigten. In den meisten Fällen waren die unter Salzstress erfolgreichen Stämme auch ohne Salzstress pflanzenwachstumsfördernd. Im Falle des Teststammes 15 wäre in weitergehenden Untersuchungen zu ermitteln, ob hier möglicherweise ein für Salzstressbedingungen „spezialisierte“ Stamm vorliegt. Insgesamt konnten neben FZB24[®] mit Hilfe des beschriebenen Zea mays – Testsystems mindestens sechs Stämme ermittelt werden, die in einem nächsten Schritt unter Gewächshausbedingungen auf die Relevanz und den Grad der gefundenen pflanzenfördernden Fähigkeiten geprüft werden sollen. Geeignete Stämme sollen zukünftig als Biofertilizer für speziell aride Klimabedingungen entwickelt werden.

Tabelle 1: Phytoeffektive Leistung (Sprosslänge Spl, Wurzellänge Wl, Pflanzengewicht Gg) aus-gewählter Bakterienstämme im Pflanzentest mit *Zea mays* (Merkmale mit positiven, statistisch signifikanten Unterschieden zur Kontrolle sind fett und mit Grossbuchstaben geschrieben, positive, nicht signifikante Unterschiede kursiv und mit Kleinbuchstaben, fehlende Unterschiede sind durch Striche gekennzeichnet)

Stamm	Salzkonzentration (%)		
	0	0,6	0,9
FZB24	Spl, Wl, Gg	Spl, Wl, Gg	Spl, Wl
1	A, Wl, Gg	-	Wl
2	Wl, Gg	-	Spl, A, Wl, Gg
3	Wl, Gg	-	<i>spl</i>
4	Wl, Gg	-	-
5	-	Wl	Gg
6	Wl	-	<i>Gg</i>
7	Wl	-	-
8	Spl, Wl, Gg	<i>spl, gg</i>	Spl, Gg
9	Spl, Wl, Gg	<i>spl, wl, gg</i>	Spl
10	Spl, Wl, Gg	Spl, Wl	Spl
11	Spl, Wl, Gg	Spl, Wl, Gg	<i>spl, a, gg</i>
12	Wl, Gg	-	-
13	<i>spl, wl, a, gg</i>	<i>spl, wl, a, gg</i>	<i>spl</i>
14	<i>spl, wl, gg</i>	<i>spl, wl, a,</i>	A
15	<i>spl, wl, a, gg</i>	<i>Wl</i>	Spl, A, Gg

Literatur

- BOCHOW, H.: Phytosanitary Effects of *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agent.- Med.Fac.Landbouww.Univ.Gent, 57/2b, 387-393, 1992.
- BOCHOW, H., EL-SAYED S.F., JUNGE, H.: Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. IV. Salt-stress tolerance induction by *Bacillus subtilis* FZB24 seed treatment in tropical vegetable field crops, and its mode of action.- Zeitschr. PflKrankh. 108(1), 21-30, 2001.
- DOLEJ, S.: Wirkungen von Stoffwechselprodukten des Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* im Pathosystem Tomate (*Lycopersicon esculentum*) – *Fusarium oxysporum f.sp.radialis-lycopersici*.: Dissertation, Humboldt Universität zu Berlin, 1998.
- FILIPPI, C., BAGNOLI, G., TREGGI, G., PICCI, G.: Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*: Plant and Soil. 80, 119-125, 1993.
- JUNGE, H., KREBS, B., KILIAN, M.: Strain selection, production, and formulation of the biological plant vitality enhancing agent FZB24® *Bacillus subtilis*.- Pflanzenschutz-Nachr. Bayer1/00,1, 94-104, 2000.
- SNEATH, P.H.A., MAIR, M.E., HOLT, I.G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2.Ed. William&Wilkins,Baltimore,1986.

(Manuskript eingelangt am 18. Dezember 2001, angenommen am 15. Jänner 2002)

Entwicklung einer praxisgerechten Formulierung und Applikationstechnik von hypovirulenten *Cryphonectria parasitica* - Stämmen zur biologischen Bekämpfung des Edelkastanienrindenkrebsses in Österreich

Development of a formulation and application technique of hypovirulent *Cryphonectria parasitica* - strains usable in practice for biological control of chestnut blight in Austria

THOMAS RÜHMER & MICHAEL STELZL
Hygienicum, Institut für Mikrobiologie & Hygiene-Consulting GmbH

Zusammenfassung

Der Edelkastanienrindenkrebs bedroht seit mehr als zehn Jahren die heimische Edelkastanie *Castanea sativa*. Ganze Bestände in den ansonsten dichten Laubwäldern der südlichen Steiermark und des Burgenlandes sind durch diese Krankheit abgestorben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Präparat, der „Pilzkleister“, entwickelt. Pilzmycelien von hypovirulenten Stämmen von *Cryphonectria parasitica* werden in eine Matrix auf Stärkebasis eingebettet und können so einfach für Behandlungen des Rindenkrebsses eingesetzt werden. Der Pilzkleister nutzt das Prinzip der übertragbaren Hypovirulenz von *C. parasitica* für die Auslösung der Heilungsreaktionen. Durch den Pilzkleister ist eine direkte Behandlung von Befallsstellen mit gutem Erfolg möglich. Die direkte Behandlung mit hypovirulenten Pilzstämmen von *Cryphonectria parasitica* ermöglicht gleichzeitig die künstliche Verbreitung der Hypovirulenz in Österreich. Ein natürliches Auftreten der Hypovirulenz in Österreich konnte bisher noch nicht beobachtet werden. Der Pilzkleister ist ein Jahr lang lagerfähig und in der Praxis gut anwendbar.

Stichwörter: *Cryphonectria parasitica*, Hypovirulenz, Pflanzenschutz, Kastanie, Edelkastanie, Rindenkrebs, Formulierung, Applikation, biologischer Pflanzenschutz, *Castanea sativa*, Krankheit

Summary

More than ten years chestnut blight is threatening the native chestnut tree in Austria *Castanea sativa*. Entire stands in otherwise dense deciduous woods of Southern Styria and Burgenland have died because of this disease. In the framework of these studies a formulation - the „Pilzkleister“ (= fungal goo) - has been developed. Fungal mycelia of hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* are embedded in a starch-based matrix and are simple usable for treatments of chestnut blight. The „Pilzkleister“ is using the

principle of transmissible hypovirulence of *C. parasitica* for causing healing reactions. Highly successful direct treatments of necroses get possible with the „Pilzkleister“. The direct treatment with hypovirulent fungal strains of *Cryphonectria parasitica* makes artificial dissemination of hypovirulence in Austria possible at the same time. Natural occurrence of hypovirulence has not been observed in Austria until now. The „Pilzkleister“ is storable for one year and well-applicable in practice.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence, plant protection, chestnut, edible chestnut, blight, formulation, application, biological plant protection, *Castanea sativa*, disease

Einleitung

Der Edelkastanienrindenkrebs wurde in Österreich erstmals 1964 von Prof. Donaubaueer beschrieben. In den letzten zehn Jahren hat sich die Krankheit, die vom Ascomyceten *Cryphonectria parasitica* ausgelöst wird, stark ausgebreitet. Aufgrund der geographischen Verbreitung der heimischen Edelkastanienart *Castanea sativa* sind vor allem die Regionen der Steiermark südlich von Graz sowie das südliche Burgenland von dieser Pilzkrankheit betroffen (WAINDINGER-WILHELM, 1993).

Der Pilz dringt über Wunden ins Rindengewebe ein und verstopft die Leitbahnen, wodurch Baumteile und sogar ganze Bäume aufgrund der unzureichenden Wasser- und Nährstoffversorgung absterben. Typische Eintrittswunden für den Pilz stellen hauptsächlich mechanische Verletzungen, wie zum Beispiel Veredelungs- oder Schnittstellen, Windschäden oder Wildfegeschäden, dar (Abb. 1).

In den fünfziger Jahren wurde die hypovirulente Form des Pilzes *Cryphonectria parasitica* vom italienischen Wissenschaftler Antonio Biraghi entdeckt. Die Eigenschaften dieser hypovirulenten Pilzform verursachen ein deutlich schwächeres Krankheitsbild. Mikroskopische Untersuchungen des Österr. Forschungszentrums Seibersdorf haben gezeigt, dass die Pilzhypen der hypovirulenten Pilze im Gegensatz zu den virulenten Formen nicht in die Rindenzellen eindringen. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionen bei Befall mit beiden Formen jeweils differieren (KUDERA ET AL., 2001). Durch diese abgeschwächte Symptomatik ist der Baum in der Lage, die Befallsstelle durch Kallusbildung zu überwuchern und die Krankheit zu überleben.

Die hypovirulenten Merkmale werden durch ein Virus ausgelöst. Dieses Virus gehört zu den Mycoviren und besteht aus einer Doppelstrang-RNA (dsRNA) ohne Proteinhülle (MACDONALD & FULBRIGHT, 1991).

Diese dsRNA wird nicht in die sexuellen Vermehrungseinheiten, die Ascosporen übertragen, ist jedoch in den Hyphenzellen und Konidiosporen zu finden (CHEN ET AL., 1993; HEINIGER & RIGLING, 1994). Durch Hyphenanastomosen kann die dsRNA auf virulente Formen übertragen werden, was eine Konversion zur hypovirulenten Form bewirkt. Das Prinzip der übertragbaren Hypovirulenz ist die Grundlage für die Entwicklung dieser biologischen Bekämpfungsmethode. Diese Konversion findet beinahe ausschließlich zwischen Pilzen derselben vegetativen Kompatibilitätsgruppe (VC-Gruppe) statt. In Österreich wurden bisher 15 unterschiedliche VC-Gruppen kartiert,

wobei über 80% der Pilzisolat nur zu zwei VC-Gruppen gehören (KUDERA ET AL., 2001).

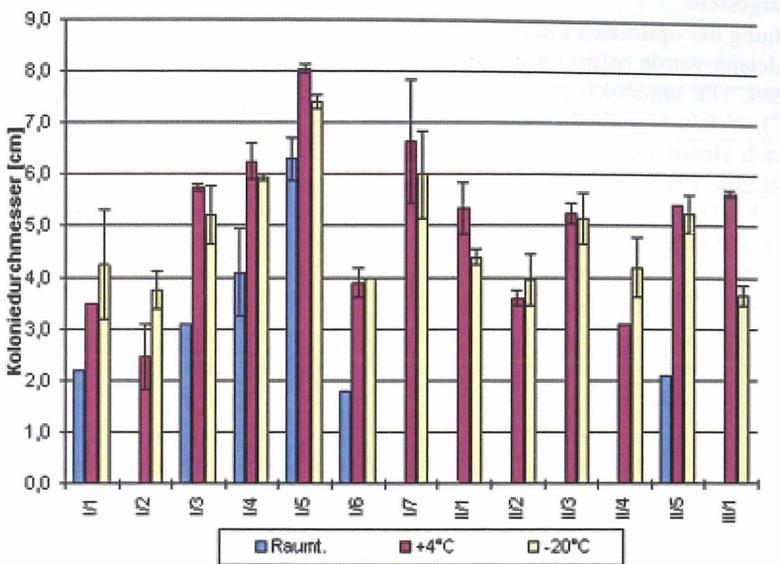


Abb. 1: Typisches Krankheitsbild des Edelkastanienrindenkrebses.
 Fig. 1: Characteristic disease symptoms of chestnut blight.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Formulierung und die Optimierung der Applikationstechnik zur Ausbringung hypovirulenter *Cryphonectria parasitica* - Stämme. Wichtige Kriterien für die Entwicklung einer geeigneten Formulierung sind die Wachstumseigenschaft der Pilzmycelien, die Lagerfähigkeit des Präparates und die Wirtschaftlichkeit des Produktionsprozesses.

Material und Methoden

- **Pilzstämme:**
 Für die Versuche wurden 13 hypovirulente *Cryphonectria parasitica* - Stämme, die in vitro konvertiert wurden, verwendet. Die 13 Stämme wurden von Frau Dr. Eva Wilhelm vom Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf zur Verfügung gestellt und gehören zu drei unterschiedlichen VC-Gruppen. Die Konversion der Pilzstämme wurde im Labor des Österreichischen Forschungszentrums Seibersdorf durchgeführt.
- **Nährmedium:**
 Für die Laborversuche und die Stammhaltung wurde Kartoffel-Glucose-Agar mit Zusatz von 100mg/l Methionin und 0,2 mg/l Biotin (PDA_{mb}) verwendet (A-NAGNOSTAKIS, 1982a).
- **Pilzkleister:**

Mycel der hypovirulenten Pilzstämmen wird in eine Stärkematrix eingebettet und in sterile Einmalspritzen eingefüllt. Dabei sind die Pilzzellen gleichmäßig in der gesamten Matrix verteilt. Der Kleister wird jeweils mit einem einzigen *C. parasitica*-Stamm hergestellt.

- Untersuchung der optimalen Lagerungsbedingungen für den Pilzkleister:
Der Pilzkleister wurde sofort nach der Herstellung bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert. Die untersuchten Temperaturbedingungen umfassten Raumtemperatur (ca. 22°C), Kühlschrankbedingungen (ca. +4°C) und Tiefkühlbedingungen (ca. -20°C). Nach einem Jahr wurde eine Spatelspitze des Pilzkleisters entnommen und zentral auf eine PDA_{mb}-Platte gelegt. Es wurden jeweils drei Parallelansätze untersucht. Die Platten wurden sieben Tage bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Durchmesser der Kolonien wurden durch Abmessen nach der Bebrütung bestimmt und als Wachstumswerte für die Auswertung herangezogen.
- Optimierung der Applikation:
Auf einer Versuchsfläche in der Südsteiermark wurden Befallsstellen ausgewählt. Die Nekrosen waren durchschnittlich 100 cm² groß. Die Behandlung erfolgte mit zwei Methoden:
 1. Es wurde ober- und unterhalb der Befallsstelle mit einem Akkubohrer ein 8 mm starkes Loch gebohrt. Je nach Nekrosengröße müssen verschieden viele Löcher gebohrt werden. Es sollte möglichst auf eine vollständige Eingrenzung der Befallsstelle von allen Seiten geachtet werden. In die Löcher wurde der Pilzkleister gefüllt und mit einem Abdeckband abgedeckt. Das Abdeckband wurde nach 14 Tagen wieder entfernt. Die Entwicklung der behandelten Stelle wurde laufend beobachtet und dokumentiert.
 2. Ober- und unterhalb der Nekrose wurde ein rechteckiger Rindenlappen geschnitten, der mit seiner Oberseite am Trieb hängenblieb. Auch hier muss bei der Behandlung auf eine möglichst vollständige Eingrenzung geachtet werden. Unter den Lappen wurde der Pilzkleister gefüllt, der Rindenlappen wurde angedrückt und mit dem überquellenden Kleister verstrichen. Eine Abdeckung ist bei dieser Methode nicht notwendig. Die Entwicklung der behandelten Stelle wurde laufend beobachtet und dokumentiert.

Ergebnisse

- Eigenschaften der hypovirulenten *C. parasitica* - Stämme in Kleisterformulierung
Entnimmt man mit dem Spatel einen kleinen Teil der Formulierung (Durchmesser = 3 bis 5 mm), so befinden sich darin Mycelfragmente, die wachstumsfähig sind, das heißt das Pilzmycel ist gleichmäßig in der gesamten Matrix verteilt. Die Wachstumsleistung der Pilzstämmen wird durch die Formulierung nicht beeinflusst. Die Koloniebildung der Pilze auf Nährbodenplatten zeigt durch das Einbetten in die Matrix keine Veränderungen.
- Eigenschaften des Präparates „Pilzkleister“
Der Pilzkleister weist eine pastenartige, schmierige Konsistenz auf. Das Präparat ist aufgrund der sterilen Produktionstechnik wenig anfällig für Schimmelbildung. Die Ausgangsprodukte sind günstig und leicht verfügbar. Somit wurde auch der ökonomische Aspekt für die Herstellung der Formulierung berücksichtigt.

Der Herstellungsprozess ist durch die sterile Arbeitstechnik und das manuelle Abfüllen in die Einmalspritzen entsprechend aufwändig und kann noch weiter vereinfacht und automatisiert werden.

- Lagerfähigkeit des Pilzkleisters (Abb. 2)

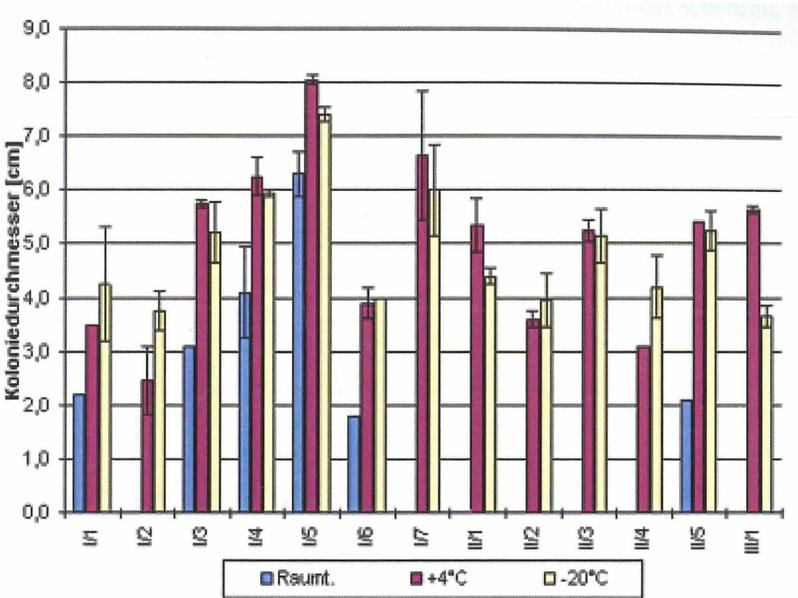


Abb. 2: Wachstumswerte der 13 hypovirulenten Versuchsstämme in Kleisterformulierung auf PDA_{mb}-Platten nach einer Lagerzeit von 12 Monaten bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen.

Fig. 2: Growth values of the 13 hypovirulent test strains formulated as „Kleister“ (=goo) on PDA_{mb}-petri dishes after the storage time of 12 months at different temperatures.

Der Pilzkleister ist über einen Zeitraum von 12 Monaten bei kühlen Bedingungen gut lagerfähig. Die Temperaturen sollten dabei möglichst unter +4°C liegen und nicht unter 0°C absinken, da ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren die Pilzzellen schädigen kann. Ein einmaliges Einfrieren hingegen kann durchaus als Lagerungsform gewählt werden. Eine Aufbewahrung bei Raumtemperatur zeigt negative Auswirkungen auf das Wachstum des Pilzmycels.

Der 12 Monate gelagerte Pilzkleister zeigt hinsichtlich der Wachstumsleistung der hypovirulenten Stämme einen Unterschied im Vergleich zur ungelagerten Formulierung direkt nach der Produktion, der als statistisch nicht signifikant ermittelt wurde (siehe Abb. 3).

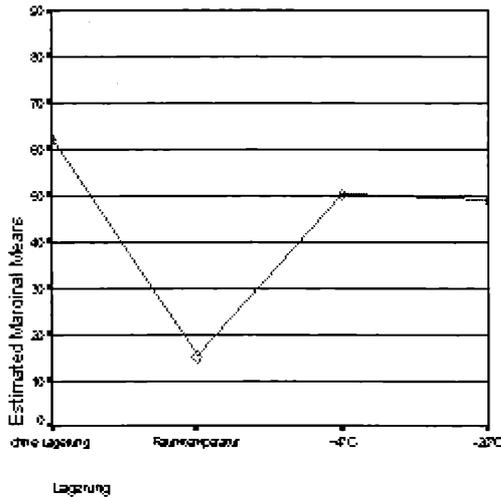


Abb. 3: Gemittelte Wachstumswerte nach einem Jahr Lagerzeit bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen. Als statistisch signifikant wird nur der Unterschied der Raumtemperatur zu den anderen Temperaturen und der ungelagerten Formulierung ausgewiesen.

Fig. 3: Growth means after one year storage at different temperatures. Only the difference between room temperature and the other ones and non-stored formulation respectively is statistically significant.

- **Optimale Applikationstechnik**

Die einfachste Methode zur Ausbringung des Pilzkleisters stellt die Methode des Anschneidens eines Rindenlappens dar (siehe Abb. 4). Durch das Andrücken des Rindenlappens wird ein Auswaschen des Kleisters nach dem Aufbringen verhindert. Der Pilz dringt in dieser Zeit in das Rindengewebe ein und kann dort weiterwachsen. Der Materialaufwand für diese Methode ist minimal. Für das Anschneiden der Rinde ist nur ein Messer mit einer scharfen Klinge notwendig.

Der optimale Behandlungszeitpunkt ist das Frühjahr, wenn die Edelkastanie im Saft steht und keine Frostgefahr mehr besteht, bei warmen Witterungsbedingungen sind Behandlungen bis in den Herbst möglich. Es wird empfohlen, eine Erstbehandlung mit den zwei in Österreich dominanten VC-Gruppen durchzuführen. Die erwünschte Heilungsreaktion nach einer solchen Behandlung ist in Abb. 5 dargestellt. Sollte keine Heilung erfolgen, wird eine Probe aus der Nekrose entnommen, die VC-Gruppe bestimmt und die Befallsstelle mit dem entsprechenden hypovirulenten Konversionspartner weiterbehandelt.



Abb. 4: Applikationsstelle nach Behandlung mit der Rindenlappenmethode

Fig. 4: Application after treatment according to bark-lobe-method



Abb. 5: Behandelte Nekrose mit erwünschter Heilungsreaktion. Erstes Bild: direkt nach der Behandlung, zweites Bild: zwei Jahre nach der Behandlung mit Pilzkleister.

Fig. 5: Cured necrosis with desired reaction. First picture: right after treatment, second picture: two years after treatment with Pilzkleister (= fungal goo).

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeiten konnte eine Formulierung für hypovirulente *Cryphonectria parasitica* - Stämme entwickelt werden, in der die Pilze lagerfähig sind und das Wachstum des Pilzmycels während der Lagerung uneingeschränkt erhalten bleibt. Das Mycel ist dabei in eine Matrix eingebettet, die auf einer Stärkemischung basiert. Die entwickelte Formulierung wird als „Pilzkleister“ bezeichnet. Mit diesem Pilzkleister ist es möglich, durch direktes Aufbringen Befallsstellen zu behandeln. Schwierig und teilweise unmöglich ist die Behandlung mit dieser Methode bei schwer zugänglichen Stellen und älteren Bäumen, die einige Meter Höhe erreichen können.

Zur Behandlung solcher Problemstellen ist eine künstliche Verbreitung der Hypovirulenz in betroffenen Regionen notwendig. Zu diesem Zweck ist eine Sensibilisierung von jungen Edelkastanien in der Baumschule der nächste Schritt der Applikationsoptimierung. Durch die Behandlung von solchen Jungbäumen sind diese auf der einen Seite selber vor einem Angriff durch virulente Pilzstämme geschützt. Auf der anderen Seite wird durch das Aussetzen der Jungpflanzen gleichzeitig hypovirulentes Pilzmaterial in ein bestimmtes Gebiet eingebracht und kann auf natürlichem Wege weiter verbreitet werden. Für die Weiterverbreitung sind hauptsächlich der Wind und tierische Vektoren verantwortlich. Insekten stellen sicher den wichtigsten tierischen Vektor dar (ANAGNOSTAKIS, 1982b; WILLEY, 1982).

Es besteht noch weiterer Forschungsbedarf zur Optimierung der biologischen Bekämpfungsmethode gegen den Edelkastanienrindenkrebs in Österreich. Zur Zeit steht ein Präparat zur Verfügung, zur Ermittlung der besten Verbreitungstechnik der Hypovirulenz werden noch weitere Forschungsarbeiten durchgeführt.

Literatur

- ANAGNOSTAKIS, S.: An improved defined medium for growth of *Endothia parasitica*. - Mycologia 74, 826-830, 1982a.
- ANAGNOSTAKIS, S. L.: Carpenter ants as carriers of *Endothia parasitica*. - Proceedings of the USDA Forest Service American Chestnut Cooperators' Meeting Jan. 1982, Morgantown, W.V., 111-113, edited by SMITH, H. C., MACDONALD, W. L. 1982b.
- CHEN, B., CHOI, G. H., NUSS, D. L.: Mitotic stability and nuclear inheritance of integrated viral cDNA in engineered hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. - EMBO Journal 12, 2991-2998, 1993.
- HEINIGER, U., RIGLING, D.: Biological control of chestnut blight in Europe. - Annual Review of Phytopathology 32, 581-599, 1994.
- KUDERA, U., SCHAFLEITNER, R., WILHELM, E.: Biologische Bekämpfung von Kastanienrindenkrebs mittels hypovirulenter Pilzstämme und Untersuchung der baumphysiologischen Reaktionen. - Endbericht Projekt 1.56.00041.0.0, BMLF Forschungsprojekt Nr. 1111, November 2001.
- MACDONALD, W. L., FULBRIGHT, D. W.: Biological control of chestnut blight: use and limitation of transmissible hypovirulence. - Plant Disease 75, 656-661, 1991.
- WAINDINGER-WILHELM, E.: Biologische Bekämpfung von Kastanienrindenkrebs. Forschungsbericht Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf, 1993.
- WILLEY, R. L.: Natural dissemination of artificially inoculated hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. Proceedings of the USDA Forest Service American Chestnut Cooperators' Meeting Jan. 1982, Morgantown, W.V., 117-127, edited by SMITH, H. C., MACDONALD, W. L. 1982.

(Manuskript eingelangt am 12. Dezember 2001, angenommen am 9. Jänner 2002)

RICHTLINIEN FÜR AUTOREN

1. Die Zeitschrift "Pflanzenschutzberichte" veröffentlicht Originalarbeiten aus dem Gebiet des Pflanzenschutzes und anderen Bereichen, die thematisch den Pflanzenschutz berühren. Arbeiten, die in anderen Zeitschriften veröffentlicht wurden - auch nur auszugsweise - und die eine Wiederholung bekannter Tatsachen bringen, können nicht aufgenommen werden.
2. Die Veröffentlichungssprache ist deutsch oder englisch. Eine Übersetzung von Titel, Zusammenfassung, Stichwörtern und Legenden in die jeweils andere Sprache ist beizufügen. Wissenschaftliche Namen von Gattungen und Arten sind kursiv zu schreiben. Die Tabellen sollen auf das Notwendigste beschränkt sein. Dasselbe Tatsachenmaterial soll entweder in Form von Tabellen oder in graphischer Form gebracht werden. Die Manuskripte sollen fehlerfrei sein.
3. Jedem Beitrag ist eine Zusammenfassung mit Stichwörtern und ein summary mit key words voranzustellen. Die Beiträge sollen gegliedert sein in: Einleitung, Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion und Literaturzitate. Der Umfang der Originalarbeiten soll möglichst nicht 20-25 Seiten übersteigen. Der Text sollte in Word verfasst sein und/oder in MS-Word für McIntosh abgespeichert sein. Excel-Grafiken sollten als tif-Datei abgespeichert sein. Die Artikel können auf Datenträgern oder per email (gbedlan@bfl.at oder aplenk@bfl.at) übermittelt werden.
4. Bilder können nur aufgenommen werden, wenn sie reproduktionsfähig sind. Bei mikroskopischen Aufnahmen ist der Vergrößerungsmaßstab anzugeben. Die Bilder sind zu kennzeichnen. Bilder sollten als tif oder eps Dateien abgespeichert werden.
5. Literaturzitate sind im Text mit dem in Kapitälchen geschriebenen Namen des Autors und in Klammer beigefügter Jahreszahl des Erscheinens der zitierten Arbeit anzugeben, z. B. MAYER (1963) oder (MAYER, 1963). Unter dem Abschnitt "Literaturzitate" ist anzuführen: Zuname, abgekürzter Vorname, Titel der Arbeit, Name der Publikation, Nummer des Bandes oder Jahrgangs, Anfangs- und Schlussseite, Erscheinungsjahr, z. B. GÄUMANN, E.: Die Rostpilze Mitteleuropas. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Band XII; 1959. BRUCK, K. P., SCHLÖSSER, E.: Getreidefußkrankheitserreger. V Antagonismus zwischen den Erregern. - Z.PflKrankh.PflSchutz 89, 337-343, 1982.
6. Der Autor erhält einmalig Korrekturabzüge, von denen einer korrigiert zurückgegeben werden muss. In den Korrekturbögen dürfen nur mehr Satzfehler berücksichtigt werden.
7. Jeder Autor erhält von seiner Originalarbeit unberechnet 30 Sonderdrucke Darüber hinaus benötigte Sonderdrucke müssen bei Erledigung der Korrektur auf eigene Kosten bestellt werden.

Satzspiegel:

Ränder: oben 2 cm, unten 8,4 cm, links 1,8 cm, rechts 6,7 cm

Überschriften: Titel Arial 14 pt fett, Abstand nach dem Absatz 6 pt,
übersetzter Titel Arial 11 pt fett,
Gliederungsüberschriften Arial 10 pt fett, Abstand nach dem Absatz 6 pt.

Text: Times New Roman 10 pt, einzeilig, Blocksatz

Die Manuskripte werden von zwei unabhängigen Referenten anonym beurteilt. Über die Annahme entscheidet die Schriftleitung, unterstützt von deren Mitarbeitern.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Pflanzenschutzberichte](#)

Jahr/Year: 2002

Band/Volume: [60_2002_1](#)

Autor(en)/Author(s): diverse

Artikel/Article: [Pflanzenschutzberichte Band 60/Heft 1 2002 1-68](#)