

Ergebnisse zur Lagerung, Sortenanfälligkeit und Aggressivität von *Peronospora parasitica* an Winterraps

E. KLODT-BUSSMANN und V.H. PAUL

Universität-GH Paderborn, Labor für Biotechnologie und Qualitätssicherung,
Windmühlenweg 25, 59494-Soest (Deutschland)

Zusammenfassung

Laboruntersuchungen ergaben, dass die Verwendung kryoprotektiver Additive die Langzeitlagerung von *P. parasitica*-Konidien im Gefrierschrank bei -21°C über einen Zeitraum von einem Jahr ermöglicht. Damit konnte eine wesentliche Erleichterung für Untersuchungen zur Biologie des Falschen Mehltau-Erregers erreicht werden.

Mit einem Keimblatt-Test wurde eine einfache und zeitgünstige Methode etabliert, um Winterraps-Sortenunterschiede sowie um Unterschiede in der Aggressivität verschiedener *P. parasitica*-Herkünfte zu ermitteln.

1. Einleitung

Untersuchungen zur Biologie des Falschen Mehltau-Erregers an Winterraps erfordern wegen der regelmässig anfallenden Erhaltungsarbeit einen hohen Material- und Arbeitsaufwand. Um für diese Untersuchungen jederzeit über ausreichend Infektionsmaterial sowie einer Auswahl von verschiedenen *P. parasitica* Herkünften verfügen zu können, wurden verschiedene *in vitro* Lagerungsversuche durchgeführt.

Die aus der Literatur bekannten Methoden zur Lagerung von Konidien verschiedener Oomyceten in Flüssig-N (BROMFIELD & SCHMITT, 1967 ; DAHMEN et.al., 1983) oder nach Lyophilisation im Gefrierschrank (STAFFELDT, 1961), führten bei *P. parasitica* nicht zum Erfolg. Untersuchungen zur Lagerung von Konidien im Gefrierschrank bei -21°C ohne vorhergehende Lyophilisation unter Verwendung von kryoprotektiven Additiven hingegen ergaben erste vielversprechende

Ergebnisse (KLODT-BUSSMANN & PAUL, 1993). Die in dieser Kurzzeituntersuchung erfolgreichsten Additive wurden in einem Lagerungsversuch über einen Zeitraum von einem Jahr überprüft.

Für die praktische Pflanzenzüchtung ist es von Interesse, mit einer einfachen und zeitgünstigen Methode Winterraps-Sortenunterschiede hinsichtlich *P. parasitica*-Anfälligkeit zu ermitteln, wobei mögliche Aggressivitätsunterschiede berücksichtigt werden sollen. Da bisher keine entsprechendes Testverfahren beschrieben wurde, musste ein neues Verfahren entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Langzeitlagerung

Zur Langzeitlagerung wurde der kryoprotektive Effekt der Additive Glycerin, Polyethylenglycol (PEG) 400 und 1000 in 5, 10, 15, 20 und 25%-iger Konzentration überprüft. Es wurden jeweils drei Proben je Additiv und Konzentration a 2 ml mit einer Konidienkonzentration von 50.000 Konidien/ml in einem Lyophilegläschen bei -21°C eingefroren. Als Kontrolle diente eine Konidien suspension in aqua dest.. Die Proben wurden nach einem Lagerungszeitraum von 2 Tagen, 1 Woche, 1 Monat, 3, 6, 9 und 12 Monaten bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Probeninhalt wurde auf jeweils zwei Petrischalen mit 15%-igem Wasseragar aufgetragen. Als Indikator für die Lebensfähigkeit der Konidien wurde die Keimfähigkeit nach 24 Stunden und $17/10^{\circ}\text{C}$ und einer Hell-/Dunkelphase von 12/12h mikroskopisch ermittelt. Es wurden jeweils dreimal 100 Konidien überprüft.

2.2. Untersuchung zur Krankheitsresistenz

Zur Untersuchung von 32 Winterrapsorten auf Krankheitsresistenz wurde ein 'detached-leaf-test' mit Keimblättern entwickelt. Es wurden je Sorte 40 Keimblätter in einer Gerdaschale nach der Methode Gieffers (GIEFFERS et.al., 1989) ausgelegt. Die Keimblätter wurden anschliessend mit einer Konidien suspension von 10.000 Konidien/ml mittels einer Druckluft-Sprühpistole inokuliert. Nach der Inokulation wurden die verschlossenen Gerdaschalen in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 17/10°C und einer Hell-/Dunkelphase von 12/12h inkubiert. 10 Tage nach der Inokulation erfolgte die Bonitur der flächenmässigen Ausbreitung der Sporulation nach einem eigens für Infektionstests entwickelten Boniturschema (Tab.1). Der Versuch wurde in vierfacher Wiederholung angelegt.

Tab. 1. Allgemeines Boniturschema für *P. parasitica*

Boniturwert	Befallsfläche Keimblatt
1	kein Befall
2	1 - 25%
3	24 - 50%
4	51 - 75%
5	76 - 100%

2.3 Untersuchung von Herkünften auf Aggressivität

In Anlehnung an den Keimblatt-Test wurde die Aggressivität von sieben verschiedenen *P. parasitica*-Herkünften sowie einem Herkunftsgemisch untersucht. Es wurden die britischen Herkünfte P003 und R1, die deutschen Herkünfte Schulendorf, Heppen, Kettwig, Braunschweig, Emden und eine Mischung der Herkünfte Bittingen, Futterkamp, Mettmann, Neuengeseke, Oestinghausen, Paradiese, Solingen Wulfshagen und Wuppertal getestet. Als Testsortiment wurden die Winterrapsorten Diadem, Libravo, Ceres, Synra und die für ihre *P. parasitica*-Resistenz bekannte Sommer-rapsorte Cresor ausgewählt. In dem Test wurden in dreifacher Wiederholung 20 Keimblätter in einer Gerdaschale ausgelegt und mit je zwei Tropfen a 15 µl bei einer Konidienkonzentration von 50.000 Konidien/

ml infiziert. Zur Inkubation wurden die verschlossenen Gerdaschalen wie in Kap. 2.2 beschrieben in einer Klimakammer aufgestellt und ebenfalls nach 10 Tagen nach dem unter Tab. 1 aufgeführten Boniturschema bonitiert.

3. Ergebnisse

3.1 Langzeitlagerung

Wie zu erwarten war, sinkt generell unabhängig vom eingesetzten kryoprotektiven Additiv mit der Zunahme des Lagerungsintervalls die Keimfähigkeit der eingelagerten Konidien (Abb 1, Abb. 2 und Abb. 3). Alle drei Additive sind hierbei jedoch unabhängig von ihrer Konzentration zu allen Terminen der Variante «aqua dest.» überlegen. Die Keimfähigkeit der Konidien dieser Variante tendiert nach einem Jahr gegen Null, wohingegen bei allen anderen Varianten in unterschiedlich hohem Ausmass vitale Konidien beobachtet werden konnten.

Vergleicht man nun die drei Additive PEG 400, PEG 1000 und Glycerin, so zeigt PEG 1000 den geringsten kryoprotektiven Effekt. Auch bei einer 5%-igen Suspension dieses Additivs, die im Fall von PEG 1000 über ein Jahr die höchsten Keimraten erzielte, liegen die Werte niedriger als bei PEG 400 bzw. Glycerin.

Bei dem Additiv PEG 400 garantiert die 25% -ige Suspension über alle Termine die höchsten Keimraten, wobei nach einem Jahr noch eine Keimfähigkeit von 12% festgestellt werden konnte.

Das Additiv Glycerin hingegen weist in 10% -iger Suspension bis zu einem Monat Lagerung die höchsten Keimraten auf. Bei einem längeren Lagerungsintervall übernimmt die 20 %-ige Suspension die führende Position. Diese Konzentration zeigt auch nach einem Jahr mit 21% die höchste Keimfähigkeit im Vergleich zu den übrigen Glycerin-Konzentrationen wie auch im Vergleich zu allen Konzentrationen von PEG 400 und PEG 1000.

Allerdings müssen im Gegensatz zu den PEG-Varianten die Glycerin-Proben vor einer Infektion aufgearbeitet werden, da Glycerin zu einer frühzeitigen Seneszenz der Rapsblätter mit nur geringer bzw. fehlender Sporulation führt.

Abb. 1 : Keimfähigkeit von Konidien nach Langzeitlagerung bei -21°C unter Verwendung von Glycerin

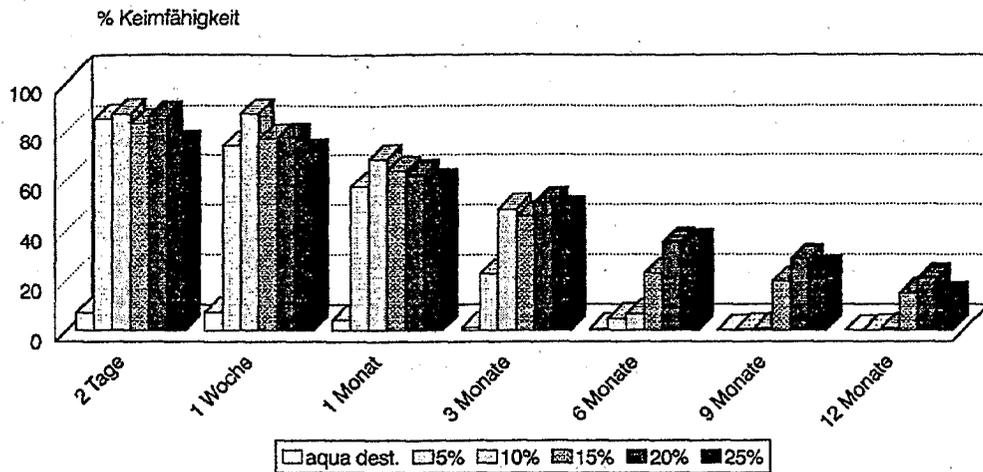


Abb. 2 : Keimfähigkeit von Konidien nach Langzeitlagerung bei -21°C unter Verwendung von PEG 400

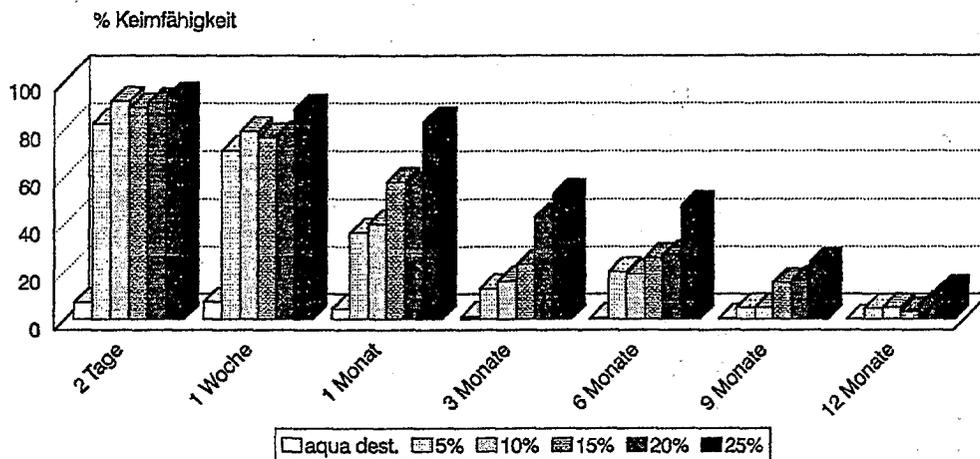
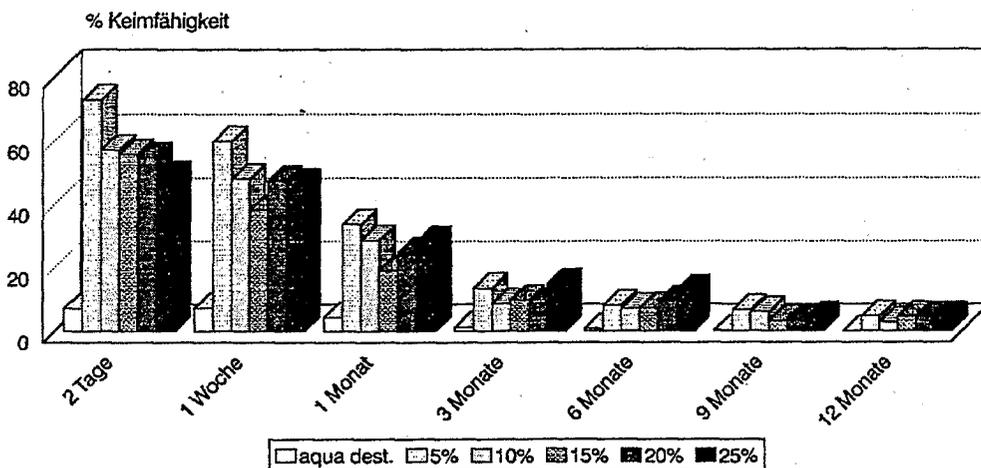


Abb. 3 : Keimfähigkeit von Konidien nach Langzeitlagerung bei -21°C unter Verwendung von PEG 1000



3.2 Untersuchung zur Krankheitsresistenz

Wie Tab.2 zeigt, erlaubt dieses Testverfahren eine sehr differenzierte Unterteilung von 32 Winterraps-Sorten bzgl. ihrer Anfälligkeit gegenüber *P. parasitica*. Die geringste Anfälligkeit gegenüber dem Krankheitserreger zeigt die Sorte Synra. Ihr folgen die Sorten

Liborius, Tapidor, Silvia und Lirektor. Am anderen Ende der Skala befinden sich als anfälligste Sorten Diadem, Doublol und Accord gefolgt von Zeus, Korina und Capricorn. Im Mittelfeld befinden sich mit zunehmender Anfälligkeit u.a. die Sorten Liberator, Envöl, Idol, Samourai, Lirajet, Maxol und Falcon.

Tab. 2 : Keimblatt-Test für die Raps-Sortenbeurteilung auf Resistenz gegen *P. parasitica*.

Sorte	Mittelwert	
Synra	3.17	a
Liborius	3.59	b
Tapidor	4.02	c
Silvia	4.06	cd
Lirektor	4.07	cd
Libravo	4.18	cde
Collo	4.24	def
Rocket	4.31	ef
Lirabon	4.38	efg
Eurol	4.41	fg
Liberator	4.42	fgh
Envöl	4.46	fgh
Wotan	4.46	fgh
Idol	4.47	fgh
Elvira	4.56	ghi
Arabella	4.57	ghij
Samourai	4.60	ghij
Olymp	4.62	ghij
Lirajet	4.65	hijk
Akela	4.74	ijkl
Maxol	4.74	ijkl
Falcon	4.79	ijklm
Libraska	4.79	ijklm
Ceres	4.85	klm
Cobra	4.89	lm
Jet Neuf	4.89	lm
Capricorn	4.94	lm
Korina	4.94	lm
Zeus	4.98	lm
Accord	4.99	m
Doublol	5.00	m
Diadem	5.00	m

3.3 Untersuchung von Herkünften auf Aggressivität

Wie aus Tab. 3 ersichtlich ist, unterscheiden sich die Herkünfte in ihrer Reaktionsweise signifikant voneinander. Der Befallsmittelwert aller Sorten von P003 ist mit 2,69 am niedrigsten, der von Emden mit 3,48 am höchsten.

Darüber hinaus wurde die Sortenanfälligkeit der verschiedenen Herkünfte betrachtet.

Aus Tab. 4 ist zu ersehen, dass im Mittel aller acht Herkünfte eine Abstufung der Sortenanfälligkeit zu erkennen ist, wie sie auch der Keimblatt-Test zeigt (Kap. 3.2) bzw. im Fall der Sorte Cresor als Hinweis in der Literatur zu finden ist (NASHAAT & RAWLINSON, 1991). Diese Abstufung der Anfälligkeit besteht ebenfalls bei getrennter Betrachtung der Herkünfte Schulendorf, R1, Heppen, Braunschweig, Kettwig, Emden und dem Mix.

Die Ausnahme stellt hierbei die Herkunft P003 aus England dar. Sie zeigt ein von den anderen Herkünften total abweichendes Reaktionsmuster. Insbesondere die Sorte Cresor ist in diesem Zusammenhang hervorzuheben. In den Aggressivitätstests mit den anderen Herkünften zeigte diese Sorte keine oder nur geringe Anfälligkeit. Gegenüber P003 avanciert sie jedoch zur anfälligsten Sorte des Testsortiments (Tab.4). Diese Eigenschaft von P003, die Resistenz von Cresor zu überwinden, ist bereits aus der Literatur bekannt (MOSS, LUCAS & CRUTE, 1991).

Somit unterscheidet sich P003 sowohl hinsichtlich der durchschnittlichen Befallsstärke als auch bzgl. der Abstufung der Sortenresistenz gegenüber den anderen sieben Herkünften. Dieser Test bestätigt somit das von MOSS, LUCAS & CRUTE (1991) beschriebene Ergebnis der besonderen Aggressivität von P003.

Tabl. 3 : Prüfung verschiedener *P. parasitica*-Herkünfte auf ihre Aggressivität (Keimblatt-Test)

Herkunft	Befallsmittelwert aller Sorten	
P003	2,69	a
R1	2,97	b
Mix*	3,04	bc
Heppen	3,27	cd
Schulendorf	3,30	d
Kettwig	3,43	d
Braunschweig	3,44	d
Emden	3,48	d

* : Mischung der Herkünfte Bittingen, Futterkamp, Mettmann, Neuengeseke, Oestinghausen, Paradiese, Solingen, Wulfshagen und Wuppertal.

Tab. 4 : Mittlere Sortenanfälligkeit für *P. parasitica* (Keimblatt-Test)

Sorte	Mittelwert über alle Herkünfte		Mittelwert von P003	
Cresor	1,44	a	3,40	b
Synra	2,60	b	1,72	a
Libravo	3,49	c	2,05	a
Ceres	4,12	d	3,22	b
Diadem	4,35	e	3,05	b

4. Danksagung

Dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie der Gemeinschaft zur Förderung der privaten deutsche Pflanzenzucht wird für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Forschungsarbeit gedankt.

5. Literatur

BROMFIELD, K.R. & SCHMITT, C.G., 1967 : Cryogenic storage of conidia of *Peronospora tabacina*. *Phytopathology*, 57, 1133.

DAHMEN, H., STAUB, T. & SCHWINN, F.J., 1983 : Technique for long-term Preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology*, 73, 241-246.

GIEFFERS, W., PAUL, V.H., RITTER, E., 1989 : Der Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudo-*

cercospora herpotrichoides (Fron) Dreighton, Merkmale zur Morphologie des Erregers und dessen Nachweis an Dikotyledonen. *J. Phytopathology* 126, 115-132.

KLODT-BUSSMANN, E. & PAUL, V.H., 1993 : First Results from simple methods of preservation of *Peronospora parasitica*. *IOBC/WPRS Bulletin* Vol. 16 (9): 25-28.

MOSS, N.A., LUCAS, J.A. & CRUTE, I.R., 1991 : Response of oilseed rape (*Brassica napus*) cultivars to infection by *Peronospora parasitica* (downy mildew) at the seedling stage. *Ann. App. Biol.* 118 (supplement) : 98-99.

NASHAAT, N.I., RAWLINSON, C.J., 1991 : Resistance to Downy Mildew in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *IOBC/WPRS Bulletin* XIV (6) : 166-173.

STAFFELDT, E.E., 1961 : Observations on lyophil preservation and storage of *Phytium* species. *Phytopathology*, 51, 259.