

Untersuchungen zur Variabilität von Isolaten des Pilzes *Cylindrosporium concentricum* Grev. an Winterraps

von M. BEINEKE (1, 2), V.H. PAUL (1) und E. SCHLÖSSER (2)

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

(2) Justus Liebig-Universität, Institut für Phytopathologie, Bismarckstr. 16, 35390-Giessen (Deutschland)

Zusammenfassung

Die Variabilität von *Cylindrosporium concentricum*-Isolaten verschiedener Herkünfte wurde anhand biologischer Parameter und der Fungizidsensitivität untersucht.

Die Parameter Mycelwachstum, Konidienbildung, Konidienlänge und Keimfähigkeit wurden überprüft und Unterschiede, besonders zwischen stark und schwach aggressiven Isolaten, beobachtet. Die Eigenschaften Konidienlänge und Keimrate zeigten statistisch signifikante Korrelationen zur Aggressivität. Weiterhin korrelierte die Konidienlänge mit der Konidienbildung und der Keim- und Wachstumsrate sowie die Keimrate mit der Wachstumsrate.

Die Überprüfung der Sensitivität gegenüber subletalen Konzentrationen der Fungizidwirkstoffe Iprodion, Tebuconazol, Carbendazim, Prochloraz und Prochloraz + Carbendazim zeigte eine große Variation zwischen den Isolaten. Es wurden Isolate mit starker, als auch schwacher Sensitivität ermittelt. Es waren jedoch keine Isolate vorhanden, die sehr empfindlich auf Carbendazim reagierten. Weiterhin schienen einige Isolate tolerant gegenüber Tebuconazol zu sein. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird diskutiert.

1. Einleitung

Die *Cylindrosporiose*, hervorgerufen durch das Pathogen *Cylindrosporium concentricum* (Teleomorph: *Pyrenopeziza brassicae* SUTTON & RAWLINSON) ist seit Ende der achtziger Jahre im deutschen Winterrapsanbau eine Krankheit mit steigender Bedeutung (Amelung & Daebeler, 1991; Paul et al., 1990), jedoch sind einige Aspekte der Biologie dieses Pilzes noch nicht geklärt.

Der Einsatz von Fungiziden zur Bekämpfung der *Cylindrosporiose* ist bereits erfolgt. Außerdem ist in verschiedenen Regionen Deutschlands der Einsatz von Fungiziden zur Bekämpfung anderer Raps-pathogene, besonders *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Alternaria brassicae* üblich (Ahlers, 1989; Paul, 1991). Es ist daher möglich, daß Fungizidwirkstoffe bereits die Sensitivität von *C.concentricum* beeinflußt haben.

C.concentricum-Isolate verschiedener Herkünfte wurden anhand der biologischen Parameter Mycelwachstum, Konidienbil-

dung, Konidienlänge, Keimfähigkeit sowie der Fungizidsensitivität auf ihre Variabilität untersucht. Zusätzlich wurde die Beziehung dieser biologischen Eigenschaften zur Aggressivität überprüft.

2. Materialien und Methoden

In den Jahren 1991-92 wurden Einsporisolate von infizierten Rapsproben aus verschiedenen deutschen und englischen Anbaugebieten hergestellt. Für die Untersuchungen der biologischen Parameter wurden 9 Isolate mit unterschiedlicher Aggressivität verwendet: schwache (Isolate TH4, SG3, BI5), mittlere (Isolate BW5, BW3, NG1) und starke (Isolate BR5, BR6, HE3) Aggressivität. Die Aggressivität wurde in vorangegangenen Versuchen durch künstliche Infizierung von Rapspflanzen unter kontrollierten Bedingungen bestimmt. Für die Überprüfung der Fungizidsensitivität wurden 68 Einsporisolate verwendet.

Alle Versuche wurden auf PDA (Kartoffel-Dextrose-Agar, pH6) in zweifacher Wiederholung unter kontrollierten Bedingungen bei 15°C konstant und Dunkelheit durchgeführt.

Das Mycelwachstum *in vitro* wurde an neun Agar-Kulturen pro Isolat 7, 14, 21 und 28 Tage nach dem Beimpfen radial gemessen.

Die Konidienbildung wurde an 28 Tage alten Kulturen jeweils dreimal pro Isolat ermittelt. Hierfür wurde demineralisiertes Wasser auf die Kulturen geschichtet, die Konidien mit einem Gummispatel abgeschabt und die Anzahl der Konidien in der so gewonnenen Suspension mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

Die Konidienlänge wurde lichtmikroskopisch mit Abstrichen von 28 Tage alten Kulturen bestimmt. Pro Isolat erfolgte die Messung an drei Proben mit jeweils 100 Konidien.

Die Keimfähigkeit der Konidien wurde auf Wasseragar (12 g Agar/l demin. Wasser) überprüft. Hierfür wurde ein ml Suspension mit 10^6 Konidien von 28 Tage alten Kulturen auf eine Agarschale aufgetragen und die Keimrate nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Drei Proben wurden pro Isolat ausgewertet.

Für die Untersuchung der Fungizidsensitivität wurden alle vorliegenden Einsporisolate auf dem Nährmedium PDA mit Zugabe subletaler Konzentrationen von Iprodion (Verisan), Tebuconazol (Folicur), Carbendazim (Custos), Prochloraz (Sportak) und einer Kombination von Prochloraz und Carbendazim (Sportak alpha) angezogen. Das Mycelwachstum wurde dann nach einer vierwöchigen Wachstumsperiode an 6 Kulturen pro Isolat gemessen. Die Wirkung der eingesetzten Fungizide war in vorangegangenen Konzentrationsversuchen exemplarisch mit einem Einsporisolat ermittelt worden. Anhand dieser Vorversuchsergebnisse konnten die Fungizidkonzentrationen, die 50% des Mycelwachstums hemmen, mittels Probit-Analyse berechnet werden (ED_{50} -Werte). Diese Konzentrationen wurden dann in den Sensitivitätsuntersuchungen zugesetzt (Tab. 1).

Tab. 1: ED₅₀-Werte der untersuchten Fungizide

Fungizid	Aktivsubstanz	(g/l)	ED ₅₀ (µg/ml)
Verisan	Iprodion	260	2,8
Folicur	Tebuconazol	250	0,018
Sportak	Prochloraz	400	0,029
Custos	Carbendazim	450	0,010
Sportak alpha	Prochloraz	300	0,012
	+Carbendazim	80	0,0032

3. Ergebnisse

3.1 Mycelwachstum

Die neun untersuchten Isolate wiesen unterschiedliche Wachstumsraten auf (Abb.1). An allen vier Meßterminen zeigten die Isolate HE3 and BW3 das stärkste und die Isolate BW5 und BI5 das schwächste Mycelwachstum. Bei den übrigen Isolaten wurde mittleres Wachstum ermittelt.

3.2 Konidienbildung

Die Konidienbildung der schwach aggressiven Isolate war signifikant niedriger als die der stark aggressiven Isolate (Abb.2). Die Isolate mit mittlerer Aggressivität zeigten uneinheitliche Ergebnisse. NG1 erreichte Werte, die denen der stark aggressiven Isolate vergleichbar sind. BW5 dagegen wies eine Konidienbildung wie die schwach aggressiven Isolate auf. Die Konidienbildung von BW3 befand sich im mittleren Wertebereich.

3.3 Konidienlänge

Die längsten Konidien konnten bei den Isolaten mit schwacher Aggressivität beobachtet werden, die kürzesten bei den stark aggressiven Isolaten (Abb.3). Die Isolate BW3 und NG1 mit mittlerer Aggressivität bildeten kurze Konidien wie die stark aggressiven Isolate. Im Gegensatz dazu produzierte das mittel aggressive Isolat BW5 Konidien mit der gleichen Länge wie die schwach aggressiven Isolate.

3.4 Keimfähigkeit

Deutliche Unterschiede zwischen der Keimfähigkeit der schwach und stark aggressiven Isolate wurden an allen vier Meßterminen ermittelt (Abb.4). Die Isolate mittlerer Aggressivität zeigten sowohl hohe (BW3) als auch geringe (BW5, NG1) Keimraten. Die Isolate mit hohen Keimraten erreichten diese innerhalb der ersten 24 Stunden, die Isolate mit niedrigen

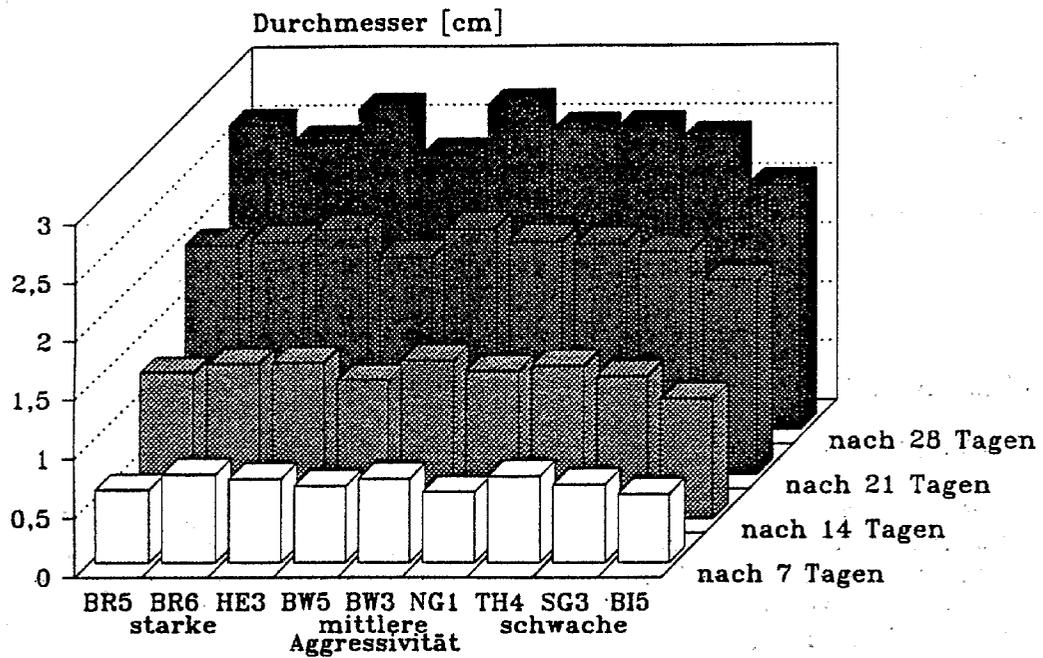


Abb.1: Durchschnittliches Mycelwachstum von neun ausgewählten Einsporisolaten 7, 14, 21 und 28 Tage nach dem Beimpfen, Mittelwerte aus drei Versuchen mit n=9.

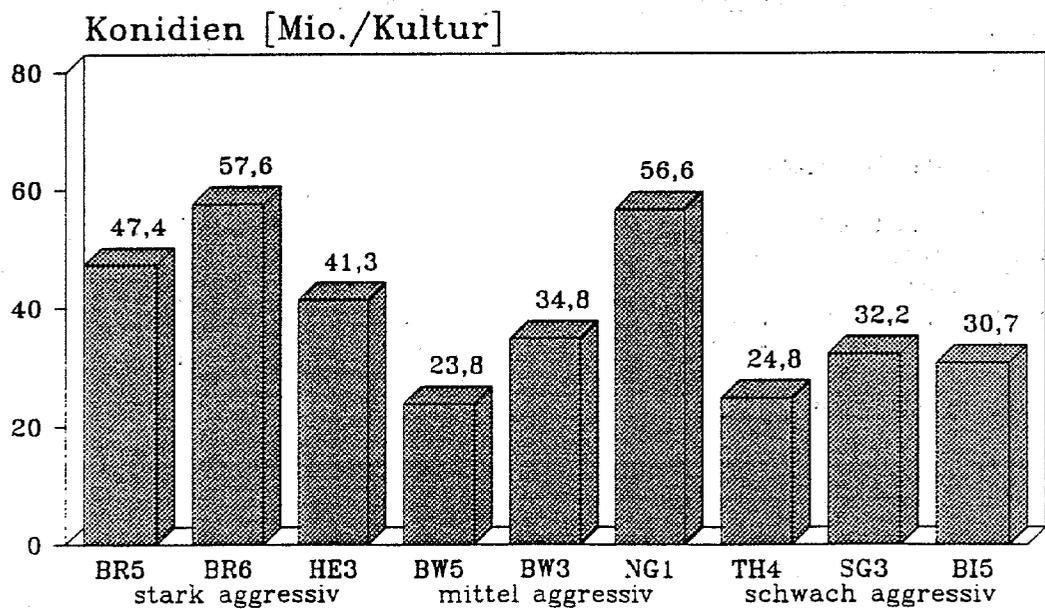


Abb.2: Durchschnittliche Konidienbildung 28 Tage alter, auf PDA gewachsener Kulturen, Mittelwerte aus drei Versuchen mit n=3.

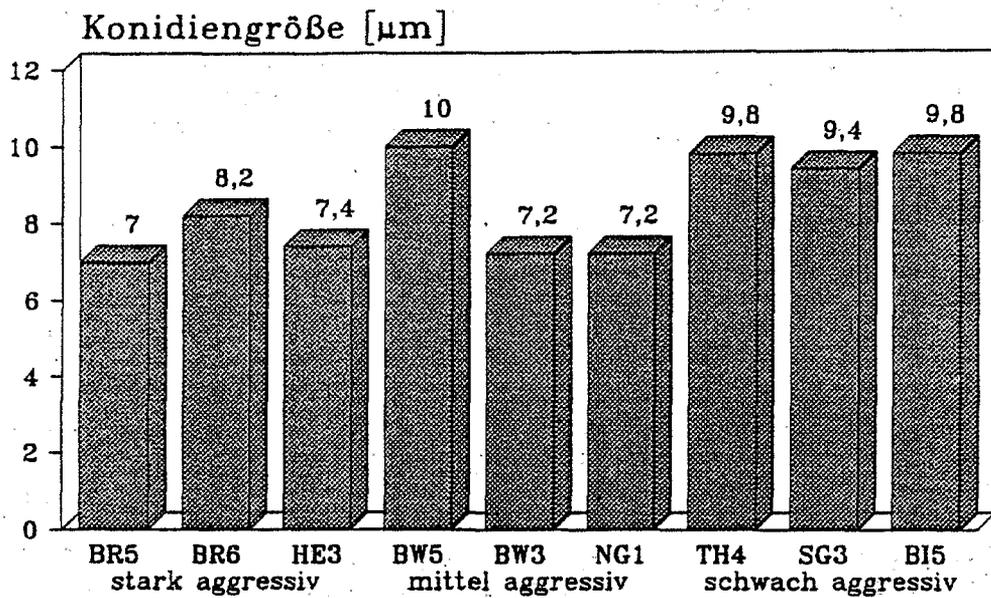


Abb.3: Durchschnittliche Größe von Konidien 28 Tage alter, auf PDA gewachsener Kulturen, Mittelwerte aus drei Versuchen mit n=3.

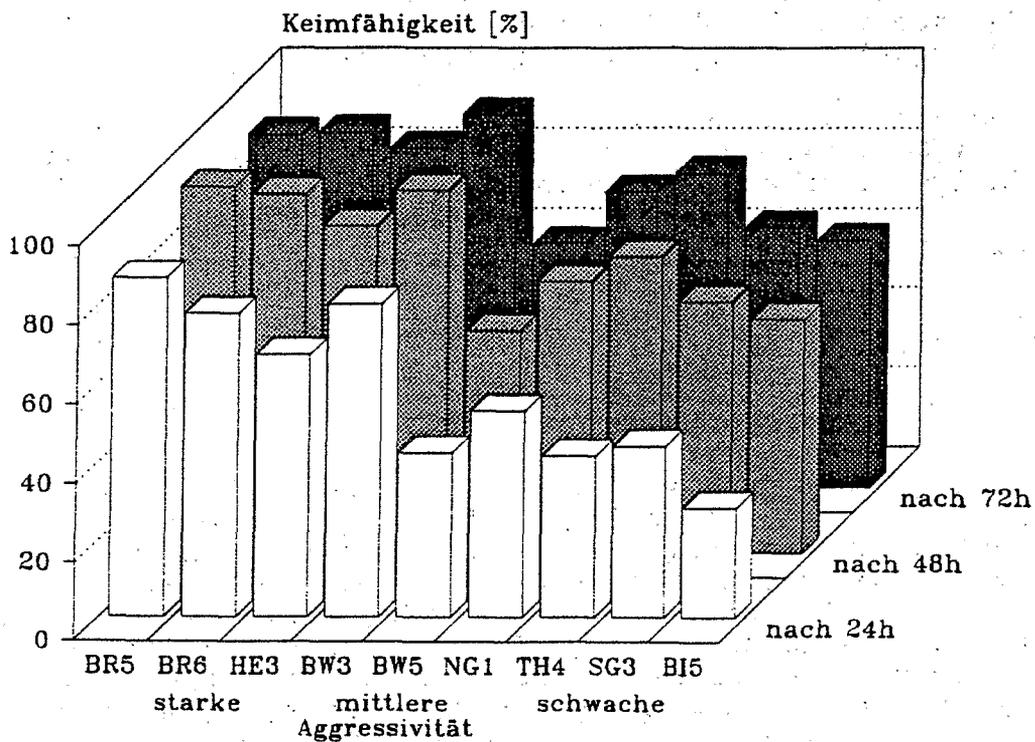


Abb.4: Durchschnittliche Keimfähigkeit nach 24, 48 und 72h von Konidien 28 Tage alter, auf PDA gewachsener Kulturen, Mittelwerte aus drei Versuchen mit n=3.

Raten dagegen erst nach 48 Stunden. In der letzten Phase des Versuches bis zu 72 Stunden konnte nur noch ein geringer Anstieg der Keimraten festgestellt werden.

3.5 Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern

Die Korrelationsanalyse wurde für die ordinalskalierten Daten (Aggressivität - Boniturnoten) mit Spearmans Test und für die intervallskalierten Daten mit Pearsons Test durchgeführt.

Tab. 2: Korrelationen der untersuchten Parameter (Pearsons und Spearmans Test, zweiseitig)

Parameter I	Parameter II	Korrelationskoeffizient mit $p < 0,05$
Konidienlänge	Konidienbildung	-0,73
Konidienlänge	Keimfähigkeit nach 24h	-0,83
Konidienlänge	Keimfähigkeit nach 48h	-0,75
Konidienlänge	Keimfähigkeit nach 72h	-0,77
Konidienlänge	Wachstum nach 21d	-0,71
Konidienlänge	Wachstum nach 28d	-0,71
Keimfähigkeit nach 24h	Wachstum nach 14d	0,70
Keimfähigkeit nach 24h	Wachstum nach 21d	0,74
Keimfähigkeit nach 24h	Wachstum nach 28d	0,69
Keimfähigkeit nach 48h	Wachstum nach 14d	0,74
Keimfähigkeit nach 48h	Wachstum nach 21d	0,73
Keimfähigkeit nach 48h	Wachstum nach 28d	0,70
Keimfähigkeit nach 72h	Wachstum nach 14d	0,80
Keimfähigkeit nach 72h	Wachstum nach 21d	0,80
Keimfähigkeit nach 72h	Wachstum nach 28d	0,76
Konidienlänge	Aggressivität	-0,78
Keimfähigkeit nach 24h	Aggressivität	0,92
Keimfähigkeit nach 48h	Aggressivität	0,76
Keimfähigkeit nach 72h	Aggressivität	0,67

Wie aus Tab.2 ersichtlich ist, korreliert die Konidienlänge negativ mit der Konidienbildung, der Keimfähigkeit und dem Mycelwachstum. Dies bedeutet, daß mit einer Zunahme der Konidienlänge die Konidienbildung, die Keimfähigkeit und das Mycelwachstum abnimmt. Eine positive Korrelation konnte dagegen zwischen Keimfähigkeit und Wachstum ermittelt werden. Weiterhin konnte eine negative Korrelation der Konidienlänge mit der Aggressivität und eine positive Korrelation der Keimfähigkeit, besonders der Keimraten nach 24 Stunden, mit der Aggressivität festgestellt werden.

3.6 Fungizidsensitivität

Die Überprüfung der Fungizidsensitivität ergab signifikante Sensitivitätsunterschiede zwischen den Isolaten. Die größte Schwankungsbreite der Wachstumsraten wurde unter Einfluß von Folicur (Tebuconazol), die geringste unter Einfluß von Custos (Carbendazim) ermittelt. Sportak (Prochloraz), Sportak alpha (Prochloraz+Carbendazim) und Verisan (Iprodion) zeigten vergleichbare Variationsbreiten (Tab.3).

Tab. 3: Mycelwachstum nach 30 Tagen Wachstum auf PDA mit Zugabe von subletalen Fungizidkonzentrationen (siehe Tab.1, ED₅₀-Werte)

Fungizid	Wachstumsraten in % relativ zur Kontrolle von bis	durchschnittliche Wachstumsrate in % relativ zur Kontrolle
Folicur	8,34 - 97,48	46,40
Verisan	5,98 - 73,71	24,04
Custos	35,13 - 87,43	62,44
Sportak	3,69 - 80,33	29,35
Sportak alpha	2,23 - 70,72	28,64

Isolate mit starker Sensitivität wurden bei allen Fungiziden, ausgenommen Custos, beobachtet. Isolate mit geringer Sensitivität wurden dagegen bei allen Fungiziden festgestellt. Unter Einfluß von Tebuconazol zeigte ein Isolat Wachstumsraten, die denen der Kontrolle vergleichbar sind, was auf eine Toleranz dieses Isolates gegenüber diesem Wirkstoff hinweist. Weiterhin wurden einige Isolate beobachtet, die eine sehr geringe Sensitivität gegenüber Tebuconazol besitzen.

Deutsche und englische Isolate erzielten vergleichbare Ergebnisse.

4. Diskussion

Die Untersuchung der biologischen Parameter ergab in den meisten Fällen eine beachtliche Variabilität der Isolate, die besonders stark zwischen den stark und schwach aggressiven Isolaten ausgeprägt war. Es konnte eine deutliche Beziehung der Parameter Konidienbildung, Konidienlänge und Keimfähigkeit zur Aggressivität beobachtet werden. Es konnte jedoch nur die negative Korrelation der Konidienlänge mit der Aggressivität und die positive Korrelation der Keimfähigkeit, besonders nach 24 Stunden, mit der Aggressivität statistisch abgesichert werden. Weiterhin statistisch abgesichert korrelierte die Konidienlänge negativ mit der Konidienbildung, der Keimfähigkeit und dem Mycelwachstum. Eine positive Korrelation bestand dagegen zwischen der Keimfähigkeit und dem Wachstum.

Die Betrachtung dieser Ergebnisse kann zu der Annahme führen, daß die Isolate, die wenige, große Konidien bilden, nur deshalb eine schwächere Aggressivität besitzen, weil die Wahrscheinlichkeit von Infektionen bei vielen Pathogenen mit der Inokulumdichte zusammenhängt (Gäumann, 1951). Bei einer hohen Inokulumdichte sind die Möglichkeiten von erfolgreichen Infektionen größer als bei einer niedrigen. Dieser Aspekt kann jedoch ausgeschlossen werden, da in allen Versuchen die Inokulumdichte auf 10^6 Konidien pro ml eingestellt wurde.

Wahrscheinlich ist die Geschwindigkeit, mit der die Konidien keimen, für den Erfolg von Infektionen und damit dem Grad der Aggressivität von besonderer Bedeutung. Pflanzen versuchen häufig den Befall von Pathogenen durch Abwehrmechanismen, die entweder bereits in der Pflanze vorhanden sind oder deren Bildung durch den Infektionsprozeß induziert wird, abzuwehren (Heitefuß, 1987; Hoffmann et al., 1985; Isaac, 1992; Schlösser, 1983). Der zuerst genannte Mechanismus ist von der zeitlichen Abfolge des Infektionsprozesses unbeeinflusst, da dieser bereits vollständig ausgeprägt in der Pflanze vorliegt. Im Gegensatz dazu ist der zweite beschriebene Mechanismus stark vom Zeitfaktor abhängig, da dieser erst durch den Angriff des Pathogens aktiviert wird. Die Effektivität der Abwehr wird daher einerseits von der Schnelligkeit der Penetration durch den Pathogen und andererseits von der Geschwindigkeit der Bildung der Abwehrmechanismen durch die Pflanze bestimmt (Schlösser, 1983). Es existieren viele Beispiele für die Abhängigkeit der Qualität und Quantität dieser Mechanismen durch den Zeitfaktor (Mansfield, 1982; Beineke & Schlösser, 1990; Zeyen & Bushnell, 1979). Dieser Zusammenhang zeigt die Bedeutung der Keimgeschwindigkeit für den Infektionsprozeß, da Konidien mit schneller Keimung weniger durch die Abwehrmechanismen der Pflanze beeinflusst werden.

Die Variabilität von *Cylindrosporium*-Isolaten wurde auch von Rawlinson et al. (1978) beobachtet. Sie stellten vergleichbare Unterschiede der Wachstumsraten fest.

Die Untersuchung der Fungizidsensitivität zeigte ebenfalls eine beachtliche Variabilität zwischen den Isolaten. Unter dem Einfluß der untersuchten Fungizide konnten sowohl Isolate mit starker als auch schwacher Sensitivität beobachtet werden. Unter Einfluß von Carbendazim konnten jedoch keine hoch empfindlichen Isolate festgestellt werden. Ein nicht sensitives Isolat und mehrere Isolate mit sehr schwacher Sensitivität wurden gegenüber Tebuconazol ermittelt.

Die Entwicklung von Fungizidresistenzen ist heute ein wichtiges Problem in der Bekämpfung von Krankheiten. Seit der Einführung systemischer Fungizide traten verschiedentlich Resistenzprobleme auf (Dekker, 1987; Georgopoulos, 1982). Gewöhnlich ist es nicht möglich, Vorhersagen über die Bildung von Resistenzen im Feld zu treffen, die auf Ergebnissen von Gewächshaus- und Laborversuchen basieren (Dekker, 1982a, 1987), jedoch können diese eine Möglichkeit oder Tendenz im Verhalten des Pathogens unter Einfluß von Fungiziden aufzeigen. Das Risiko der Entwicklung einer Fungizidresistenz bei

Einsatz von Carbendazim, einem Benzimidazol, wird als sehr hoch eingestuft und konnte bei verschiedenen Pathogenen beobachtet werden (Dekker, 1982b; Georgopoulos, 1987). *C.concentricum* soll die Fähigkeit der Resistenzentwicklung im Feld besitzen (Ilott et al., 1987). Benzimidazole sind one-site-Inhibitoren, bei denen Resistenz durch nur eine Mutation gebildet werden kann (Georgopoulos, 1987).

Tebuconazol, ein Ergosterolbiosynthese-Hemmer, gehört zur Gruppe der Triazole und ist ebenfalls ein one-site-Inhibitor. Resistenz und verminderte Sensitivität konnten bereits bei der Bekämpfung von Echten Mehltäupilzen seit Beginn der achtziger Jahre beobachtet werden (Buchenauer, 1987; Scheinflug & Kuck, 1987).

Die hier beschriebenen Fungizidversuche zeigen eine große, natürliche Variation der überprüften Isolate. Außerdem zeigte sich die Möglichkeit der Entwicklung einer Fungizidresistenz, die auftreten könnte, wenn chemische Bekämpfungen häufiger erfolgen. Dies trifft vor allem für Tebuconazol oder Triazole im Allgemeinen zu.

5. Literatur

AHLERS, D. (1989). Integrierter Pflanzenschutz bei Pilzkrankheiten im Winterraps. Gesunde Pflanze 41, 306-311.

AMELUNG, D. & DAEBELER, F. (1991). Occurrence of the fertile apothecia and the epidemiology of *Pyrenopeziza brassicae* Sutton & Rawlinson (Anamorph: *Cylindrosporium concentricum*) in the German Democratic Republic. IOBC/WPRS Bulletin 14, 147-150.

BEINEKE, M. & SCHLÖSSER, E. (1990). Wirkung von Ethirimol auf die Papillenbildung in Haferblättern nach Inokulation mit *Erysiphe graminis* f.sp. *avenae*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 55, 859-868.

BUCHENAUER, H. (1987). Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. In: H. Lyr (ed.): Modern Selective Fungicides, 205-231, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

DEKKER, J. (1982a). Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests? In: J. DEKKER, S.G. GEORGOPOULOS (eds.): Fungicide resistance in crop protection, 128-138, Pudoc, Wageningen.

DEKKER, J. (1982b). Countermeasures for avoiding fungicide resistance. In: J. DEKKER, S.G. GEORGOPOULOS (eds.): Fungicide resistance in crop protection, 177-186, Pudoc, Wageningen.

DEKKER, J. (1987). Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: H. Lyr (ed.): Modern Selective Fungicides, 39-52, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

GÄUMANN, E. (1951). Pflanzliche Infektionslehre. Verlag Birkhäuser, Basel.

GEORGOPOULOS, S.G. (1982). Detection and measurement of fungicide resistance. In: J. DEKKER, S.G. GEORGOPOULOS (eds.): Fungicide resistance in crop protection, 24-31, Pudoc, Wageningen.

GEORGOPOULOS, S.G. (1987). The genetics of fungicide resistance. In: H. Lyr (ed.): Modern Selective Fungicides, 53-62, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

HEITFUB, R. (1987). Pflanzenschutz. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

HOFFMANN, G.M., NIENHAUS, F., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H.C. & WILBERT, H. (1985). Lehrbuch der Phytomedizin. 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

ILOTT, T.W., INGRAM, D.S. & RAWLINSON, C.J. (1987). Studies of fungicide resistance in *Pyrenopeziza brassicae*, cause of light leaf spot disease of oilseed rape and other brassicas. Transactions of the British mycological Society 88, 515-523.

ISAAC, S. (1992). Fungal-Plant Interaction. Chapman & Hall, London.

MANSFIELD, J.W. (1982). The role of phytoalexins in disease resistance. In: J.A. BAYLEY, J.W. MANSFIELD (eds.): Phytoalexins. Blackie, Glasgow, London.

PAUL, V.H. (1991). Cylindrosporiose erkennen und bekämpfen. Pflanzenschutz-Praxis 1, 36-39.

PAUL, V.H., BURHENNE, S., GÜNZELMANN, A. & MASUCH, G. (1990). Zur Bedeutung von *Pyrenopeziza brassicae* für das Auftreten der Cylindrosporiose im Winterraps in Deutschland. Raps 8, 172-174.

RAWLINSON, C.J., SUTTON, B.C. & MUTHYALU, G. (1978). Taxonomy and biology of *Pyrenopeziza brassicae* sp. nov. (*Cylindrosporium concentricum*), a pathogen of winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). Transactions of the British mycological Society 71, 425-439.

SCHEINPFLUG, H. & KUCK, K.H. (1987). Sterol biosynthesis inhibiting piperazine, pyridine, pyrimidine and azole fungicides. In: H. Lyr (ed.): Modern Selective Fungicides, 173-204, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

SCHLÖSSER, E. (1983). Allgemeine Phytopathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

ZEYEN, R.J. & BUSHNELL, W.R. (1979). Papilla response of barley epidermal cells caused by *Erysiphe graminis*: rate and method of deposition determined by microcinematography and transmission electron microscopy. Canadian Journal of Botany 57, 898-913.