

## Verwendung von inertem Kultivierungsmaterial zur semi-sterilen Vermehrung von Kartoffelkrebs für Labor-Versuchszwecke nach der Glynne-Lemmerzahl Methode

Use of inert cultivation material for semi-sterile amplification of potato wart for lab-experiments applying the Glynne-Lemmerzahl method

412

### Zusammenfassung

Um semi-sterile Kartoffelkrebswucherungen für die unterschiedlichsten Untersuchungszwecke im Labor zu erhalten, wurde der methodische Schritt der Glynne-Lemmerzahl-Methode an derjenigen Stelle modifiziert, an der frisch infizierte Kartoffelkeime zur Gewinnung von Kartoffelkrebswucherungen mit Kompost überschichtet werden. Insgesamt kamen anstelle des Komposts drei verschiedene Materialien zum Einsatz: Perlite, Vliestücher und Sägemehl. Es zeigte sich, dass mit anfälligen Kartoffelsorten im Sägemehl, unabhängig vom Baumtyp, ähnlich große Wucherungen produzierbar waren wie im Kompost, während die anderen beiden Substanzen schlechtere Wucherungen hervorbrachten. Bei der Verwendung von Sägemehl waren die Kartoffelkrebswucherungen deutlich geringer kontaminiert als bei den Kompost-Varianten.

**Stichwörter:** Kartoffelkrebs, *Synchytrium endobioticum*, Glynne-Lemmerzahl Methode, Kompost, Sägemehl, Produktion von semi-sterilen Krebswucherungen

### Abstract

In order to obtain semi-sterile potato wart pathotypes for different kinds of lab-research, parts of the methodological approach of the Glynne-Lemmerzahl method were modified at the step where the wart-infected sprouts were covered with compost to generate new infective

warts. Three different subsidising substances were applied: Perlite, fleece cloths and saw dust. Only with saw dust the galls obtained were of a similar size as those from the previously used compost, independently of the kind of tree the saw dust came from, whereas the other two substances resulted in minor gall formations. The use of saw dust produced far less contaminated galls of potato wart than the compost version.

**Key words:** Potato wart, *Synchytrium endobioticum*, Glynne-Lemmerzahl method, compost, saw dust, semi-sterile wart gall production

### Einleitung

Der Kartoffelkrebserreger *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. ist ein obligat biotropher Quarantäneerreger, der in vielen Ländern zunehmend an Bedeutung gewinnt. Auch in Deutschland treten immer wieder neue Kartoffelkrebsherde in landwirtschaftlich genutzten Gebieten auf (STACHEWICZ et al., 2005). Diese Krebsherde werden zurzeit von den drei vorherrschenden Pathotypen 2, 6 und 18 verursacht. Der Pathotyp 1 tritt durch die züchterischen Erfolge in Deutschland nicht mehr neu auf.

Alle 4 Pathotypen werden zur Bestimmung der Krebsresistenz bei neuen Sorten und Linien im Julius Kühn-Institut (JKI) mit der Labor-Resistenzprüfmethode nach GLYNNE (1925) und LEMMERZAHL (1930 und 1931) verwendet. Durch die biologische Besonderheit des obligat biotrophen Pilzes kann dieser nur auf meristematischem

### Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

### Kontaktanschrift

PD Dr. Frank Niepold, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Deutschland, E-Mail: frank.niepold@jki.bund.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

September 2009

Gewebe vermehrt werden, wofür in erster Linie Keimlinge von Kartoffelknollen verwendet werden. Bei der Glynne-Lemmerzahl-Methode wird der hohe Infektionsdruck auf die Keimlinge der Kartoffelknolle ausgenutzt, der durch das schnelle Schwärmen der Zoosporen aus den Sommersori entsteht. Die Inokulationsperiode und die weitergehenden Reinfektionen in der Komposterde finden dann in speziellen Behältnissen und Klimabedingungen statt. Im Laufe der 20-tägigen Inkubation kommt es zu weiteren Reinfektionen durch freigesetzte Zoosporen im Boden bzw. im Kompost. Deutlich sichtbare Krebswucherungen entstehen bei anfälligen Kartoffelsorten, die der Krankheit auch ihren Namen gegeben haben (Abb. 1).

Treffen die Zoosporen hingegen auf Keime einer resistenten Kartoffelsorte, findet eine sofortige Abwehrreaktion am Keim statt. Diese Reaktion ist dann später als Nekrose an einem normal gewachsenen Keim sichtbar (Abb. 2).

Obwohl die Komposterde vor ihrem Einsatz gedämpft wird, ist mit einem hohen Grad an Verunreinigungen von Bodenbakterien und Bodenpilzen zu rechnen, die sich in Form von Dauersporen der Behandlung widersetzen können. Gerade wenn Untersuchungen am Kartoffelkrebs durchgeführt werden sollen, bei denen es auf die ausschließliche Infektion von Zoosporen ohne Begleitflora (Bodenbakterien, Pantoffeltierchen etc.) ankommt, ist der Ersatz des Komposts durch andere, künstliche Materialien wünschenswert.

### Ergebnisse und Diskussion

Um das Kontaminationspotential bei der Bildung von Kartoffelkrebswucherungen zu verringern, wurde der

Kompost durch verschiedene andere Materialien ersetzt. Hierbei handelte es sich um Perlit (Baustoff, Fa. Klimasan-Perlit, Würzburg), Vliestücher und Sägemehl von verschiedenen Gehölzen wie Buche, Fichte, Kiefer, sowie Nadelholzmischungen. Diese Materialien wurden feuchtnass gemacht und unter Beibehaltung der für die Krebsaufzucht und -prüfung optimalen Bedingungen von 16 bis 18 °C und 80% Luftfeuchte 20 Tage inkubiert (LANGERFELD, 1984). Bei der Verwendung der Ersatzmaterialien für den Kompost war vorgegeben, eine deutliche Reduktion der kontaminierenden Mikroorganismen zu erzielen.

Alle für diese Versuche verwendeten Augenplatten (aus Effizienzgründen wurden nur Teile einer Kartoffelknolle, die einen Keim enthalten, als viereckige Kartoffelstücke ausgeschnitten) wurden nicht, wie sonst üblich, in einer Monceren®-Lösung (Fa. Syngenta, 2 ml/l) tauchgebeizt, sondern mit der gleichen Lösung besprüht. Diese Sprühbehandlung erwies sich als ebenso effektiv wie die Tauchmethode in Monceren®-Lösung. Allerdings ist es empfehlenswert, bei dieser Sprühbehandlung mit Atemschutz zu arbeiten. Als Impfmateriale wurden Wucherungen des Pathotyps 18 verwendet, da dieser als sehr aggressiv und vital gilt.

#### Perlit

Die Verwendung von Perlit, das in vielen Bereichen zur Anzucht von Pflanzen im Gewächshaus eingesetzt wird, zeigte nur einen mäßigen Erfolg. Die erhaltenen Wucherungen waren bei der für Kartoffelkrebs anfälligen Kartoffelsorte „Erstling“ klein und verfügten somit über ein geringes Potential, bei einer erneuten Verwendung als Infektionsmaterial Kartoffelkeime erfolgreich zu infizieren. Möglicherweise hatte es an der zu grobkörnigen Struktur des Perlits gelegen (2–5 mm), die eine optimale



Abb. 1. Natürliche Krebswucherung an einer anfälligen Kartoffelsorte, konserviert in Alkohol.

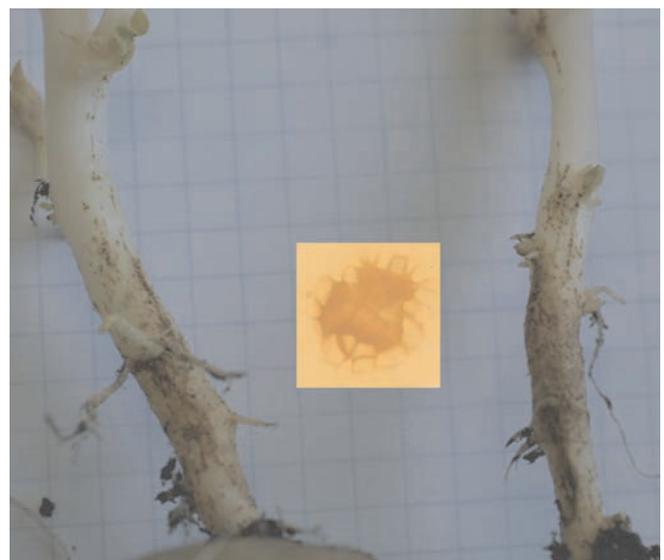


Abb. 2. Abwehrreaktion der gegen den Krebspathotyp 18 resistenten Kartoffelsorte „Tomana“, sichtbar am nekrotisierten Bereich an der Stängelbasis. Die Infektion erfolgte nach der Glynne-Lemmerzähl-Methode unter Laborbedingungen. Im Bildinnern eine Nahaufnahme einer Resistenzreaktion im Kartoffelkeimgewebe.

Reinfektion der Zoosporen im Bereich der Keime wegen des schlechten Wasserhaltevermögens verhindert hatte. Somit war Perlit als Ersatz für den Kompost nicht geeignet.

#### Vliestücher

Vliespapier bzw. Vliestücher wurden schon früher als vereinfachte Infektionsmethode verwendet (HILLE, 1959, SHARMA and CAMMACK, 1976, BROWNING, 1995). Es zeigte sich, dass bei der Verwendung von mehreren Vliestuchlagen ausschließlich der Effekt des Wassers bei der Infektion von Keimen eine Rolle spielte, da sich in den Vliestüchern im Gegensatz zum Kompost keine zusätzlichen Nährstoffe befanden. Die Vliestücher ließen nur eine punktuelle Befeuchtung der Keimspitzen zu, weshalb sich nur dort die für den Kartoffelkrebs typischen Wucherungen bilden konnten, die dann durch das Streckungswachstum des infizierten Keimes weiter nach oben geschoben wurden (Abb. 3). Mit diesen Wucherungen wäre nur eine mäßige Neuinfektion von Kartoffelkeimen erzielbar, und die schlechte Praktikabilität dieser Methode zur Kartoffelkrebsvermehrung schließt eine Verwendung von Vliespapier bzw. Vliestüchern aus.

#### Sägemehl

Um die Ausbildung von Krebswucherungen im Kompost mit unterschiedlichen Mengen an Holzanteilen zu testen, wurde Fertigerde der Fa. „Einheitserde“, Hameln, verwendet, die mit 50% Sägemehl versetzt wurde (Abb. 4). Das bei allen Versuchen verwendete Sägemehl wurde von Sägewerken als Abfall bezogen. Eine Bewertung der Ausbildung und Größe der Wucherungen fand im Vergleich zum Kompost und zu anderen Fertigerden derselben Firma statt. So hatte die Zugabe von Sägemehl

keinen messbaren Effekt auf das Wachstum des Kartoffelkrebses und die Ausbildung von Krebswucherungen.

Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der Kompost nicht schrittweise weggelassen werden kann und schließlich komplett durch Sägemehl ersetzbar ist. Mischungen aus 80% Sägemehl und 20% Kompost wurden erprobt. Da sich hier ebenfalls keine Unterschiede in der Größe der Wucherungen ergaben, wurde der Kompost bei den weiteren Versuchen völlig weggelassen.

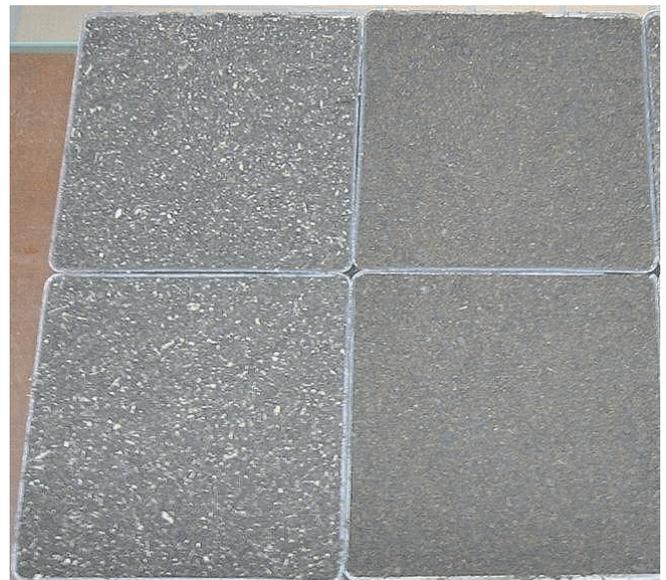
Im Vergleich zum Perlit und zu angefeuchteten Leinentüchern zeigten sich bei Verwendung von Sägemehl deutlich größere Krebswucherungen. Dabei hatte die Herkunft des Sägemehls keinen messbaren Einfluss auf die Größe der Wucherungen. Im Vergleich zum Kompost ergaben sich bei den Wucherungen in Buchen-Sägemehl keine Größenunterschiede (Abb. 5a und b).

Eine Bonitur von Wucherungen unterschiedlich anfälliger Kartoffelsorten, gewachsen in Kompost und im Vergleich dazu in Sägemehl, zeigte die gleichen Boniturnoten (Tab. 1). Selbst bei Verwendung von harzhaltigem Sägemehl aus Nadelholzmischungen waren keine Unterschiede bei der Bonitur der Wucherungen festzustellen. Zu sehen ist auch die typisch viereckige Augenplattenform der zurechtgeschnittenen Kartoffelknollen.

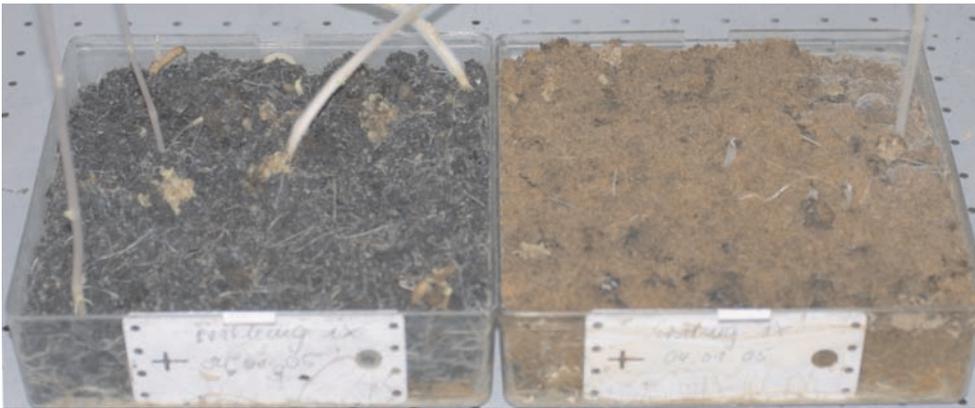
Allerdings war die Größe der Holzpartikel entscheidend für Anzahl und Ausbildung der Krebswucherungen, da diese über die Verteilung der Feuchtigkeit entscheidet, die den Zoosporen optimale Infektionsbedingungen verschafft. So ergab sich als optimale Größenverteilung der Holzpartikel eine gesiebte Größe von kleiner bis zu 1,25 mm bei 80%, wobei die restlichen 20% größer als 1,25 mm waren. Diese Größenverteilung wurde mit einer Holzmehlmischung von drei in der Umgebung von Braunschweig befindlichen Sägewerken erreicht.



**Abb. 3.** Wucherungen des Pathotyps 18, entstanden unter feuchtnassen Vliestuchlagen. Nur an den Keimspitzen kam es zur Ausbildung von Krebswucherungen, was zu einer baumartigen Ausbildung der Wucherungen führte.



**Abb. 4.** Links: Holzschnitzel/Fertigerde-Gemisch 50/50%. Rechts: 100% Kompost.



**Abb. 5a.** Krebswucherungen (Pathotyp 18) in Kompost (links) und in Buchen-Sägemehl (rechts).



**Abb. 5b.** Krebswucherungen (Pathotyp 18) in Kompost (links) und in Sägemehl (rechts).

**Tab. 1.** Bonituren von 10 ausgewählten Kartoffellinien (A-K) zu je fünf Augenplatten infiziert mit Kartoffelkrebs des Pathotyps 18 gewachsen in Kompost und im Vergleich dazu in Sägemehl. Die Boniturnoten 1 und 2 bedeuten resistent, 3 schwach resistent und 4 und 5 anfällig (BAAYEN et al., 2005). Wird nur eine von fünf Augenplatten mit 4 oder 5 bewertet, gilt die betreffende Kartoffellinie als anfällig. K repräsentiert die krebsanfällige Kartoffelsorte „Tomensa“ als Positivkontrolle

Kartoffellinie	Boniturnoten Kompost	Boniturnoten Sägemehl
A (resistent)	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1
B (anfällig)	3,2,2,5,3	2,2,4,5,5
C (resistent)	1,1,3,2,2	3,2,1,1,1
D (resistent)	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1
E (anfällig)	3,2,4,4,3	3,2,4,4,3
F (resistent)	3,3,2,2,1	3,2,2,2,3
G (anfällig)	3,3,3,4,3	1,4,4,3,3
H (resistent)	2,3,3,3,3	2,3,3,3,2
I (resistent)	2,3,2,3,2	3,1,1,2,3
K (anfällig)	4,5,5,5,4	5,5,4,4,4

Zum optimalen Wachstum des Kartoffelkrebses ist nicht die Versorgung der Wucherung mit Nährstoffen aus dem Kompost nötig, denn das Sägemehl enthält keinerlei Nährstoffe. Auch zeigten die im Holzmehl gebildeten Wucherungen die gleiche Anzahl von Sori unter dem Mikroskop (Abb. 6a und b). Im Vergleich zum Kompost scheint die Wasserverdunstung im Sägemehl wesentlich geringer zu sein, weshalb auch während der 20-tägigen Inkubationszeit weniger gewässert werden musste. Unter dem Mikroskop waren deutlich weniger kontaminierende Mikroorganismen bei der Holzmehlvariante sichtbar als bei den in Kompost gewachsenen Wucherungen. Allerdings steht eine genaue Untersuchung, in welchem Maße die Kontaminationen reduziert werden können, noch aus.

So sind in den Kartoffelknollen-Augenplatten genügend Nährstoffe vorhanden, um eine optimale Ausbildung der Wucherungen auch im nährstoffarmen Holzmehl zu ermöglichen. Das Bedeckungsmaterial dient einzig und allein zur Schaffung von feuchten Bedingungen für die Reinfektion der Keime mit den aus den Sommersori laufend freigesetzten Zoosporen.

Zum Erhalt von semi-sterilen Krebswucherungen eignet sich die Verwendung von Holzmehl auch deshalb besser als Kompost, weil sich die Keime bzw. Wucherungen

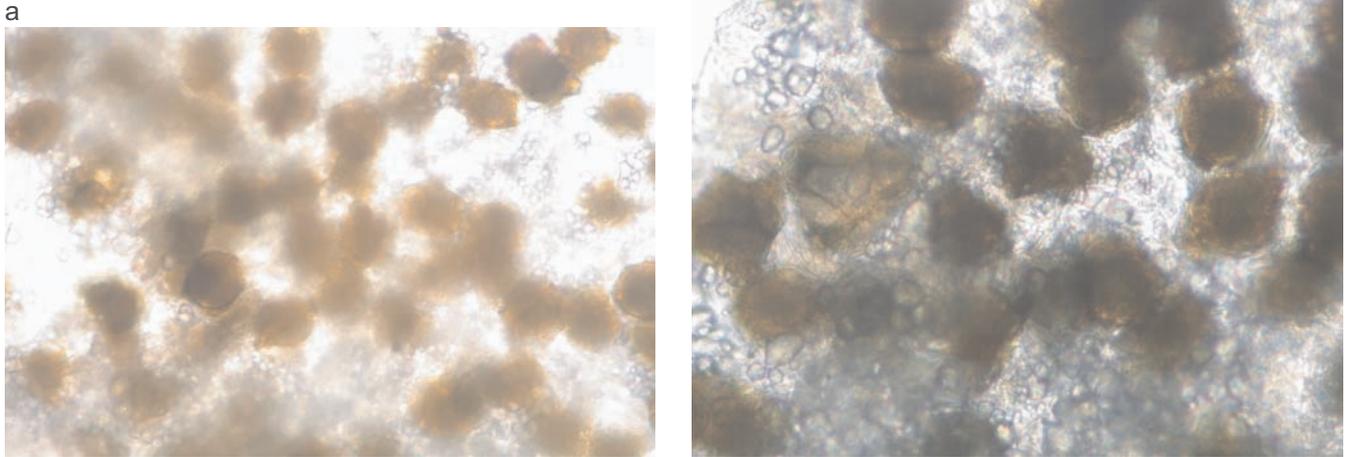


Abb. 6a und b. Mikroskopischer Ausschnitt von Kartoffelgewebe mit Sori des Kartoffelkrebs-Pathotyps 18 aus Kompost (a) und Sägemehl (b).

wesentlich einfacher von den Holzpartikeln reinigen lassen, als es bei Verwendung von Kompost wegen seines hohen Humusanteils möglich ist. Um eine noch bessere Reinigung der Wucherungen von anhaftendem Material zu erreichen, bietet sich die Verwendung eines Staubsaugers an. Nach dem Abtrocknen der Keime lässt sich das Holzmehl bequem im Staubsaugerbeutel sammeln, wodurch sich eine Beseitigung des Quarantäneabfalls einfacher gestalten lässt; denn aus quarantänerechtlichen Gründen ist eine sachgerechte Entsorgung des Abfalls notwendig vorgeschrieben.

Um in Zukunft wesentlich schneller kontaminationsfreie Wucherungen zu erhalten, sollten die zuerst verwendeten Kompost-Wucherungen desinfiziert werden, um in der nächsten Wucherungs-Generation den Gehalt an Bodenmikroorganismen so niedrig wie möglich zu halten. Hier würde sich beispielsweise Wasserstoffperoxid empfehlen, da diese Chemikalie umweltfreundlich ist und alle Mikroorganismen gleichermaßen abtötet (NIEPOLD, 1999). Zwar reagiert die Oberfläche der Kartoffelkrebs-Wucherungen ebenfalls mit dem Wasserstoffperoxid, aber die im Gewebe liegenden Sommersori werden wohl weitestgehend verschont bleiben. Eingehende Untersuchungen sind in Vorbereitung.

Erst bei wiederholten Reinokulationen der Wucherungen kann eine Keimfreiheit erzielt werden, was mit den im Holzmehl erhaltenen Wucherungen gezeigt werden soll. Auch wäre die Frage nach der Stabilität von Pathotypen in einem Vergleich zwischen den im Holzmehl und im Kompost erhaltenen Wucherungen zu klären. Ebenso könnte die Verwendung von *in vitro* Kartoffelknollen oder Kartoffelpflänzchen als bereits steriles Ausgangsmaterial sinnvoll sein, um sterile Wucherungen zu erhalten, aus denen man beispielsweise die bei der Wirt-Parasit-Interaktion entstandene mRNA ohne störende Fremd-RNA anderer Organismen gewinnen könnte.

### Danksagung

Ein Teil der Experimente wurde vom Autor im Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland des Julius Kühn-Instituts durchgeführt. Herrn H. UCHTMANN danke ich für die exzellente technische Zusammenarbeit.

### Literatur

- BAAYEN, R.B., H. BONTHUIS, J.C.M. WITHAGEN, J.G.N. WANDER, J.L. LAMERS, J.P. MEFFERT, G. COCHIUS, G.C.M. VAN LEEUWEN, H. HENDRIKS, P.H.J.F. VAN DEN BOOGERT, P. VAN DE GRIEND, R.A. BOSCH, 2005: Resistance of potato cultivars to *Synchytrium endobioticum* on field and laboratory tests, risk of secondary infection, and implications for phytosanitary regulations. OEPP/EPPO Bulletin **35**, 9-23.
- BROWNING, I.A., 1995: A comparison of laboratory and field reactions of a range of potato cultivars to infection with *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Potato Research **38**, 281-289.
- GLYNNE, M.D., 1925: Infection experiments with wart disease of potatoes *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Ann. appl. Biol. **12**, 34-60.
- HILLE, M., 1959: Ein einfaches Verfahren zur Infektion der Tomate mit *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Phytopathologische Zeitschrift **36**, 394-405.
- LANGERFELD, E., 1984: *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.; Zusammenfassende Darstellung des Erregers des Kartoffelkrebses anhand von Literaturberichten. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, H. 219, 142 S.
- LEMMERZAHN, J., 1930: Neues vereinfachtes Infektionsverfahren zur Prüfung von Kartoffelsorten auf Krebsfestigkeit. Der Züchter **2**, 288-297.
- LEMMERZAHN, J., 1931: Zur Methodik der Krebsresistenzprüfung von Kartoffelzuchtstämmen. Der Züchter **3**, 138-152.
- NIEPOLD, F., 1999: Untersuchung zur Abtötungseffizienz der Persäuren Degaclean und Clarmarin und dem Katalase-Hemmer KH10 der Fa. Degussa gegen die beiden Quarantänebakterien *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* in wässriger Suspension und im Abwasser der stärkeproduzierenden Industrie. J. Phytopathology **147**, 625-634.
- SHARMA, R., R.H. CAMMACK, 1976: A modification of the Glynne-Lemmerzahl method for testing resistance of potato varieties to wart disease, *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Potato Research **19**, 165-167.
- STACHEWICZ, H., K. FLATH, F. NIEPOLD, 2005: Methoden zur Bewertung der Kartoffelkrebsresistenz. Kartoffelbau **6**, 1-6.