

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Berlin

## Eine neue klassische Methode zur Bestimmung des *Colletotrichum*-Befalls an Saatgut von *Lupinus* spp.

A new classical method to detect *Colletotrichum* on seeds of *Lupinus* spp.

Von Uta Feiler und Helgard I. Nirenberg

### Zusammenfassung

Es wird ein Agarplattentest zur schnellen Bestimmung des quantitativen *Colletotrichum*-Befalls von Lupinensaatgut vorgestellt. Für den Nachweis des Erregers wurde ein typisches, auf einem synthetischen, nährstoffarmen Medium (SNA) leicht erkennbares morphologisches Merkmal, das Appressorium, gewählt. Der Test ist sowohl kostengünstig als auch einfach zu handhaben und erlaubt die Feststellung des Saatgutbefalls mit dem Anthraknosepilz bis zu einer Genauigkeit von 1%, wenn 300 Samen untersucht werden. Der Vorteil gegenüber den bisherigen Testmethoden wird erörtert.

**Stichwörter:** Anthraknose, *Colletotrichum* spec., Häufigkeit, *Lupinus* spp., Nachweis, Saatgut

### Abstract

The paper offers a method for the rapid identification of *Colletotrichum* on lupin seeds. For the detection of the pathogen, a typical, on a synthetic, low nutrient medium (SNA) easily recognizable morphological feature of the fungus, the appressorium, has been chosen. The test is inexpensive and simple to carry out and allows the detection of the anthracnose fungus on lupin seeds with an accuracy of 1%, if 300 seeds are examined. The advantage of this method over the until now applied tests is pointed out and discussed.

**Key words:** Anthracnose, *Colletotrichum* sp., detection, frequency of occurrence, *Lupinus* spp., seeds

### Bedeutung der Anthraknose

In den letzten Jahren hat die rasche Ausbreitung der Lupinenanthraknose, auch Brennfleckenkrankheit genannt, weltweit zu beträchtlichen Ausfällen in der Ernte geführt. Verursacht wird die Krankheit durch eine *Colletotrichum*-Art. Die Taxonomie dieses Pilzes wird in einer späteren Veröffentlichung behandelt.

Der Schadpilz ist seit 1914 in Lateinamerika bekannt (siehe FREY, 1985). Anfang der 90er Jahre wurde der Erreger an Lupine auch in Europa beobachtet (GONDRAN, 1992; FRENCEL et al., 1996; GONDRAN, 1996; FEILER, 1998).

Diese Mykose vernichtete in Österreich im Jahre 1993 einen beträchtlichen Teil der Bestände von *Lupinus albus*, wodurch der Lupinenanbau in Frage gestellt wurde.

Auch in Deutschland wird seit 1994 auf die Anthraknose als ein ernstzunehmendes Problem für den Lupinenanbau hingewiesen (ANONYM, 1994, 1997). Einer Umfrage entsprechend war die

Krankheit bereits 1995 in einem großen Teil lupinenanbauender Betriebe aufgetreten, und teilweise wurde bereits eine Reduzierung der Lupinenanbaufläche aufgrund der Ertragsausfälle erzwungen (FEILER und RÖMER, 1996).

Von der Ausbreitung der Anthraknose sind nicht nur europäische Länder betroffen. 1994 ist sie erstmals auch in Australien an Lupinen festgestellt worden (COWLING et al., 1996).

Eine wesentliche Ursache für das epidemiologische Auftreten der Krankheit ist ihre Samenbürtigkeit. Demzufolge kommt der Saatgutübertragung besondere Bedeutung zu. Durch regen Saatguttransfer und der damit einhergehenden Verschleppung des Pathogens ist die Brennfleckenkrankheit zur bedeutsamsten Lupinenkrankheit geworden. Die Tatsache, daß der Schaderreger hauptsächlich mit dem Saatgut übertragen wird, eröffnet die Möglichkeit, die primäre Infektionsquelle und damit die Ausbreitungsherde im Feld klein zu halten: Nachdem der Befallsgrad ( $\geq 1\%$ ) des Saatgutes festgestellt worden ist, darf kein mit *Colletotrichum* verseuchtes Saatgut weder für Zuchtzwecke verwendet werden noch zur Vermehrung oder in den Anbau gelangen.

### Bisherige klassische Testmethoden

Bisher existierte kein Test, der dem Praktiker eine genaue Aussage über den Befall des Saatgutes mit dem Schaderreger ermöglichte. Vor allem zwei Verfahren wurden bislang zum Nachweis des Anthraknoseerregers eingesetzt. Bei dem einen werden Samen auf Kartoffeldextroseagar in Petrischalen ausgelegt, bei 20 °C mit Schwarzlichtbestrahlung aufgestellt, und nach 7–10 Tagen werden die Konidien aus den Acervuli des Pilzes mikroskopiert (Acervuli-Test). Bei der zweiten Methode wird an Lupinenkeimlingen, die in Keimrollen angezogen wurden, das Brennfleckensymptom auf den Kotyledonen bonitiert (Keimrollen-Test).

Bei der ersten Methode erhält man zu geringe Befallszahlen, wenn die Konkurrenz der saprophytischen Pilze stark ist, sie das Pathogen überwachsen bzw. den Erreger am Auswachsen hindern. Ähnlich sind die Ergebnisse, wenn der Samen sehr trocken ist (nach Lagerzeiten über einem halben Jahr) und der Pilz daher mehrere Tage zum Auswachsen aus dem Sameninneren benötigt. Außerdem ist der Aufwand groß, da von jedem *Colletotrichum*-ähnlichen Konidienlager (orange-rosa Färbung) ein mikroskopisches Präparat anzufertigen ist, um mit Sicherheit den Erreger der Anthraknose nachweisen zu können. Bei einer alleinigen Bonitur der Konidienlager auf der Samenschale, ohne mikroskopische Absicherung, bestehen Verwechslungsmöglichkeiten mit anderen Pilzen: Vor allem *Fusarium*-Arten zeigen ähnliche Symptome in Form vieler orange-rosafarbener Tröpfchen (Sporodochien) auf der Samenschale; diese Verwechslung kann zu er-

höhten Befallszahlen führen. Die Nutzung der Keimrollenmethode führt oft zu einer hohen Befallszahl, da Flecken auf derartig angezogenen Keimlingen auch von anderen – sogar nicht pathogenen Pilzen – verursacht werden. Die ausschließliche Bonitur des Symptoms „Brennflecken“ ist außerdem recht ungenau, da die Abgrenzung zu unspezifischen Flecken schwierig ist. Um mit Sicherheit von einem Anthraknosebefall sprechen zu können, ist daher die Isolierung des Erregers aus den Befallsstellen nötig, was wiederum einen erhöhten Arbeitsaufwand darstellt.

### Vorstellung des neuen klassischen Tests

Das Fehlen resistenter Lupinensorten und effektiver Bekämpfungsmethoden erschwert eine rasche Eindämmung der Krankheit. Solange keine Methode vorhanden ist, mit welcher *Colletotrichum* am Saatgut sicher lokalisiert werden kann, ist es nicht möglich, eine exakte Diagnose durchzuführen oder die Ausbreitung der Anthraknose über das Saatgut zu verhindern. Am Institut für Mikrobiologie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, ist deshalb eine Saatguttestmethode entwickelt worden, die mit einfachen Mitteln Aussagen zum Befallsgrad des Saatgutes mit dem Erreger der Anthraknose erlaubt. Der Erarbeitung des Tests liegt die Prüfung verschiedener Nährmedien, Oberflächensterilisationsverfahren, Temperatur- und Belichtungsvarianten zugrunde. Als Versuchsmaterial wurden sowohl Chargen von *Lupinus albus* als auch von *Lupinus luteus* und *Lupinus angustifolius* genutzt. In der nachstehenden Tabelle werden die unterschiedlichen Anthraknosebefallsergebnisse der beiden klassischen Saatgutuntersuchungsmethoden denen des neuen Plattentests (Appressorien-Test) gegenübergestellt.

### Material

#### Untersuchungsmaterial

Es sind mindestens 300 Lupinenkörner pro Saatgutcharge zu untersuchen. Die Mindestanzahl der Körner basiert auf der statistischen Wahrscheinlichkeit, daß mindestens  $3 \times 100$  Samen auf Befall mit einem Pilz bonitiert werden müssen, um einen 1%igen Befall nachweisen zu können (SHU GENG et al., 1983).

#### Untersuchungsmedium

Für den Appressorientest hat sich SNA (synthetischer nährstoffarmer Agar (NIRENBERG, 1976)) mit Zusatz von Antibiotika als geeignet erwiesen.

#### Zusammensetzung des SNA

1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g  $\text{KNO}_3$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g KCl, 0,2 g Glucose, 0,2 g Saccharose, 22,0 g Agar Agar (Unipath GmbH,

**Tab. 1. Vergleich der Ergebnisse aus drei verschiedenen *Colletotrichum*-Testverfahren bei Verwendung von je 300 Lupinensamen aus einem schwach (Sorte 1) und einem stark anthraknoseverseuchten (Sorte 2) Bestand**

	Acervuli-Test	Keimrollen-Test		Appressorien-Test
	<i>Colletotrichum</i> -befallene Körner (%)	Körner mit Flecken <sup>1</sup> (%)	<i>Colletotrichum</i> -Isolierung aus den Flecken (%)	<i>Colletotrichum</i> -befallene Körner (%)
Sorte 1	0	68,7	0	1
Sorte 2	44	33	20	100

<sup>1</sup> Keine der Symptome an den Kotyledonen waren als typische Brennflecken zu erkennen, daher wird allgemein von Flecken gesprochen

Technischer Agar Nr. 3 [Oxoid]), 1000 ml aqua bidest, 0,6 ml 1 n NaOH.

#### Antibiotika für SNA

100 mg/l Penicillin G, Fa. Sigma, Nr. PEN-NA, 10 mg/l Chlor-tetracycline, Fa. Sigma, Nr. C-4881, 50 mg/l Streptomycinsulfat, Fa. Sigma, Nr. S-6501. Antibiotika in möglichst wenig sterilem Wasser lösen und dem auf 60 °C abgekühlten, autoklavierten Agar zugeben. In eine Petrischale 13 ml Agar gießen und erkalten lassen. Nur frisch gegossene Platten verwenden.

#### Durchführung

##### Desinfektion

- Zur Feststellung des endogenen Befalls des Saatgutes mit *Colletotrichum* wird der Samen 4 Minuten in 10%igem Danchlorix (300 ml für 300 Samen) oberflächensterilisiert. Nach viermaligem Nachspülen mit Wasser werden jeweils 5 Körner pro SNA-Platte (mit Antibiotika) ausgelegt.
- Zur Feststellung des exogenen und endogenen Befalls des Saatgutes mit *Colletotrichum* ist keine Oberflächensterilisation nötig.

##### Temperatur- und Lichtbedingungen

Die Inkubation der Platten erfolgt bei 22 °C im Dauerdunkel.

##### Anzuchtdauer

Die Petrischalen werden 10–21 Tage bebrütet. Die erste Bonitur erfolgt nach 10 Tagen. Sollte noch kein *Colletotrichum* ausgewachsen sein, muß die Bonitur nach 21 Tagen wiederholt werden. Vor allem bei starkem Konkurrenzdruck durch andere Pilzgattungen der Mykozoenose und bei gebeiztem Saatgut wird eine längere Anzuchtdauer für den Auswuchs des Anthraknosepilzes benötigt.

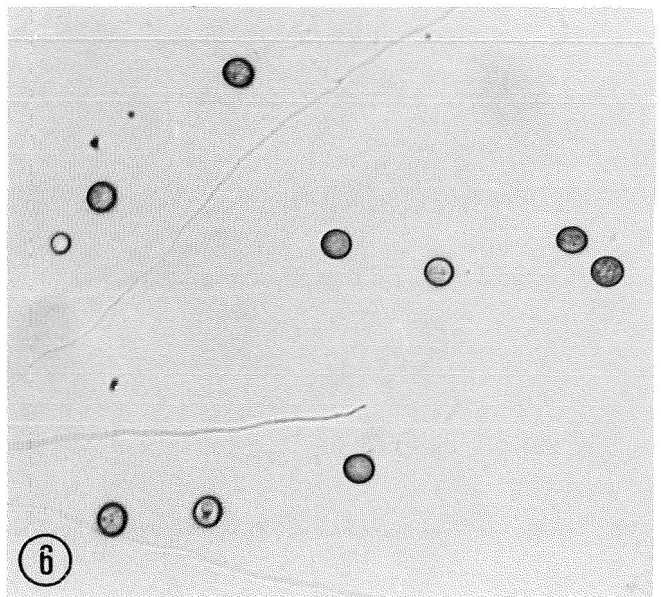
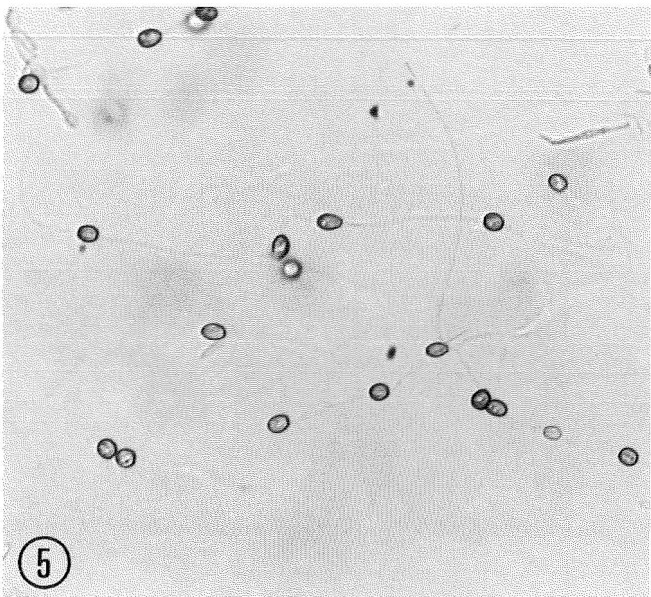
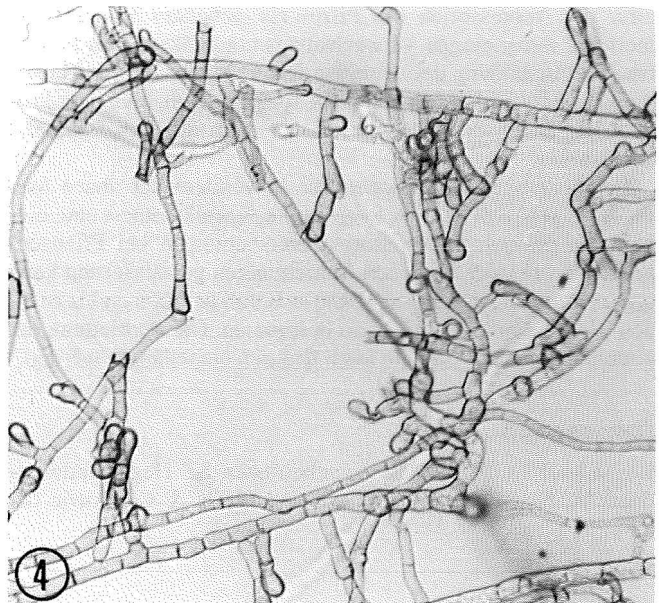
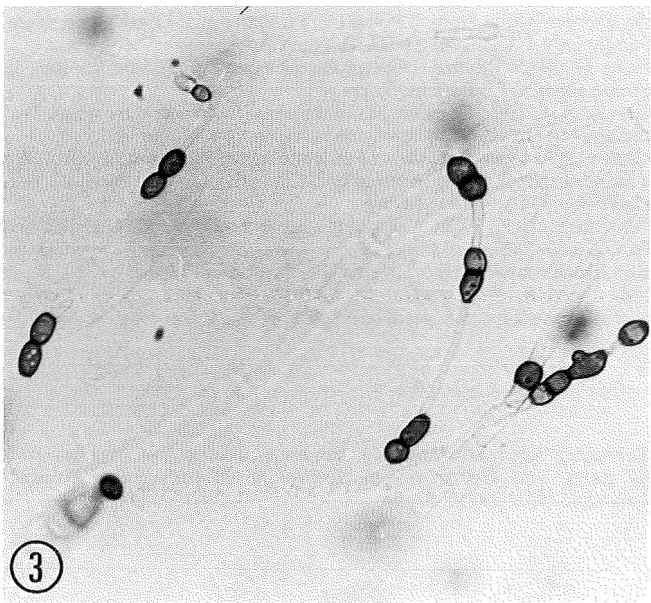
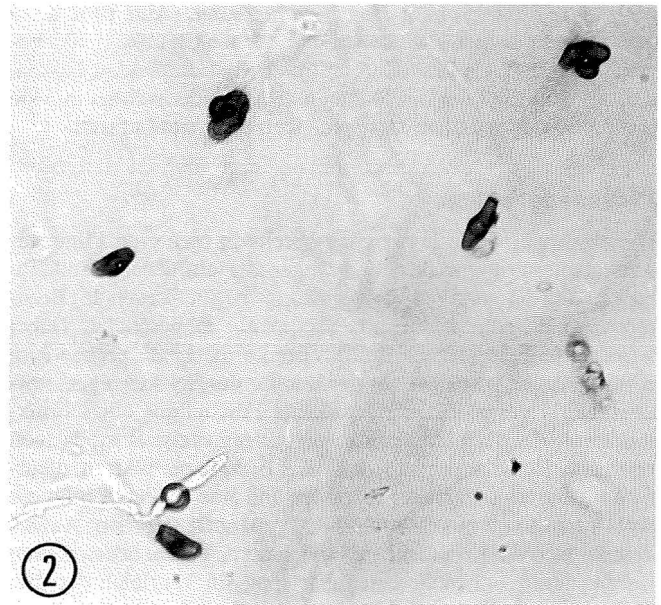
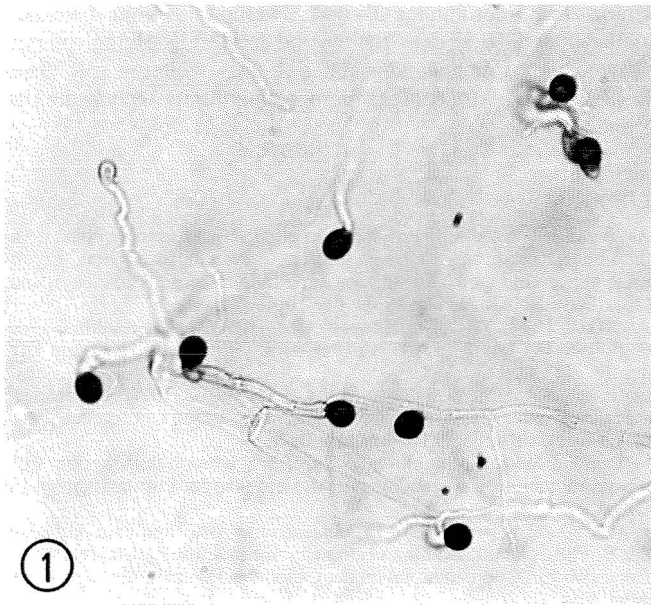
##### Bonitur

Nach 10tägiger Inkubationszeit werden die Platten mikroskopisch auf das Vorhandensein von Appressorien von *Colletotrichum* bonitiert (siehe Abbildung). Sie bilden sich ausschließlich am Plattenboden, weshalb die Agarplatten von der Unterseite aus im Durchlicht bei 100facher Vergrößerung (10er Objektiv und 10er Okulare) mikroskopiert werden müssen. Besonders eingehend ist der Agarboden rund um den Samen zu untersuchen. Die Appressorien sind subglobos (Abb. 1) oder länglich-oval geformt, wobei letztere zuweilen auch einseitig schwach zugespitzt (Abb. 2) aussehen können. Manchmal sind ihre Konturen leicht gebuchtet. Auf jeden Fall sollten sie immer dunkelbraun gefärbt sein. Im Durchschnitt messen die Appressorien 4–6 µm wenn subglobos, wenn länglich 10 × 4–5 µm. Um sie nicht mit Strukturen anderer Pilze wie z. B. Chlamydosporen von *Phoma eupyrena* (Abb. 3) sowie parenchymatischem Gewebe von *Alternaria infectoria* (Abb. 4) oder Chlamydosporen von *Verticillium*

Abb. 1 und 2. Verschieden geformte Appressorien von *Colletotrichum* spec., dem Anthraknose-Erreger der Lupine, am SNA-Plattenboden; × 500

Abb. 3 bis 6. Morphologisch ähnliche Merkmale anderer Pilze am Plattenboden; diffuse, dunkle Stellen im Hintergrund weisen auf ebensolche im Agar; × 500;

3. Chlamydosporen von *Phoma eupyrena*
4. Parenchymatisches Gewebe von *Alternaria infectoria*
5. Chlamydosporen von *Verticillium nigrescens*
6. Chlamydosporen von *Humicola fuscoatra*





*nigrescens* (Abb. 5) bzw. *Humicola fuscoatra* (Abb. 6) u. a. zu verwechseln, sollten alle oben beschriebenen Charakteristika beachtet werden. Als besonders hilfreich sind die beiden Fakten, daß Appressorien nur am Plattenboden gebildet werden und sie im Gegensatz zu Chlamydosporen niemals kreisrund sind.

### Praxistauglichkeit

Die Methode wurde inzwischen bereits in mehreren Pflanzenschutzämtern angewendet und wegen der einfachen Handhabbarkeit und der geringen Verwechslungsmöglichkeiten des Boniturmerkmals „Appressorium“ als positiv eingeschätzt. Dabei wurde besonders deutlich, daß das Boniturmerkmal „orange-rosa Konidienlager“, welches für die Bonitur des Schaderregers vor dem häufig verwendet wurde, für die Feststellung eines *Colletotrichum*-Befalls an Lupinensaatgut wenig geeignet ist, da auch noch eine Reihe anderer Pilze, wie z. B. *Fusarium*-Arten, derartig gefärbte Konidienlager ausbilden und eine exakte Bonitur die Anfertigung von mikroskopischen Präparaten erfordert. Außerdem können die Konidienlager von anderen Pilzen überwachsen werden und nicht mehr erkennbar sein. Im Vergleich der drei *Colletotrichum*-Testmethoden ist daher die mikroskopische Bonitur der Appressorien des Pilzes als sicherstes Erkennungsmerkmal mit geringen Verwechslungsmöglichkeiten zu bewerten. Die Ausbildung der Appressorien erfolgt bestens im Dauerdunkel und erfordert folglich keine spezielle Belichtung der Proben. Die Nachweismethode ist daher auch als energiesparend einzustufen.

Die bisherigen Erfahrungen bei Anwendern der neuen Methode zeigen, daß der hier vorgestellte Agarplattentest eine einheitliche Grundlage für Saatgutuntersuchungen bei Pflanzenschutzämtern oder ähnlichen Einrichtungen gewährleisten kann und es möglich ist, den Anthraknose-Befall an Lupinen bis zu einem Befall von  $\geq 1\%$  sicher zu bestimmen. Die Verbreitung der Krankheit über das Saatgut kann dadurch eingedämmt werden.

### Danksagung

Besonderer Dank gilt den Zuchtbetrieben SZ Hege, Südwestdeutsche Saatzeit, SZ Steinach und Gruse & Co, sowie der

Union zur Förderung der Öl- und Eiweißpflanzen für die finanzielle Unterstützung der Arbeiten und der Bereitstellung von umfangreichem Untersuchungsmaterial. Des Weiteren gilt unser Dank Frau HEIDRUN ANDERS für ihre zuverlässige technische Unterstützung.

### Literatur

- ANONYM, 1994: Aktuelle Probleme im praktischen Lupinenanbau: „Anthraknose, Unkrautregulierung, Impfung“. Arbeitsmaterialien, Ergebnisse der „round table“ Diskussion zur 3. Heidelberger Lupinentagung, GFL (Gesellschaft zur Förderung der Lupine), 5 pp.
- ANONYM, 1997: Wichtige Hinweise zur Brennfleckenkrankheit (Anthraknose) bei Lupinen. Arbeitsmaterialien, GFL (Gesellschaft zur Förderung der Lupine), 2 pp.
- COWLING, W. A., M. W. SWEETINGHAM, R. G. SHIVAS, 1996: Anthracnose – The Australian Experience. 8th International Lupin Conference, Pacific Grove, California, USA. Abstract Book.
- FEILER, U., 1998: Anthraknose an Lupinen – Überblick bisheriger Forschungsergebnisse. Proceedings der 4. Heidelberger Lupinentagung. Im Druck.
- FEILER, U., P. RÖMER, 1996: Ergebnisse einer Umfrage zum Auftreten der Brennfleckenkrankheit an Lupinen (Anthraknose) im Jahre 1995 in Deutschland. Arbeitsmaterialien der Gesellschaft zur Förderung der Lupine, 3 pp.
- FRENCEL, I., E. LEWARTOWSKA, A. CZERWINSKA, 1996: First report on Anthracnose of white lupin in Poland. 8th International Lupin Conference, Pacific Grove, California, USA. Abstract Book.
- FREY, F., 1985: Pflanzenschutzprobleme beim Anbau von Lupinen in Südbrasilien. GTZ-Bericht, 58 pp.
- GONDRAN, J., 1992: The diseases of the white lupin crops in France. Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes, 5–8.
- GONDRAN, J., 1996: Anthracnose of white lupin: European prospects for a future sustainable crop. International Lupin Conference, Pacific Grove, California, USA. Abstract Book.
- NIRENBERG, H. I., 1976: Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw. Berlin-Dahlem **169**, 1–117.
- SHU GENG, R. N. CAMPELL, M. CARTER, F. J. HILLS, 1983: Quality control programs for seedborne pathogens. *Plant Disease* **67** (2), 236–242.

Kontaktanschrift: Dr. Helgard I. Nirenberg, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mikrobiologie, Königin-Luise-Str. 19, D-14195 Berlin