

Sauerstoffeinfluss auf die Bildung von Pilzsporen

(Influence of oxygen on the production of fungal spores)

Von Werner J. Gieffers, MPI für Züchtungsforschung, Köln

Zusammenfassung: Experimente zeigten, dass Pilzpathogene unter ionisiertem Sauerstoff verstärkt Sporen bildeten. Ionisierter Sauerstoff wurde durch UV-Lichteinwirkung oder durch einen Ionisator erzeugt. Höchste Sporenmengen wurden unter dem Einfluss von UV-Licht kombiniert mit Wasserstoffperoxid oder unter Ionisatoreinwirkung gebildet. Pilze, die unter üblichen Laborbedingungen nur geringe Sporenmengen bildeten, bildeten unter dem Einfluss von ionisiertem Sauerstoff massenweise Sporen. Unter diesen Bedingungen wurde eine erhöhte Sporenbildung der Gattungen *Alternaria*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pseudocercospora* und *Verticillium* erreicht.

Summary: Experiments demonstrated that pathogenic fungi produced a high amount of spores by ionized oxygen. Ionized oxygen was formed by UV light or by an air ionizer. Fungi which produced in the lab only few spores under normal conditions made a lot of spores by ionized oxygen. The genera *Alternaria*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pseudocercospora* and *Verticillium* developed a significantly increased spore number under these conditions.

1 Einleitung

Im Gegensatz zu den meist gering differenzierten Thalli der Pilze stellen ihre Sporen differentielle Organe dar, die unerlässlich zur Detektion einer Spezies sind. Neben dieser Bedeutung für die Taxonomie werden Sporen von pilzlichen Pathogenen als Inokulum für Befallsprüfungen, für Resistenztests oder zur Charakterisierung von Erreger und Wirt benötigt. Außerdem können quantitative Sporenanalysen für vergleichende Untersuchungen zum Krankheitsbefall, z. B. für epidemiologische Studien, genutzt werden. Entscheidend für die Realisierung solcher Aufgabenstellungen ist die Gewinnung der Sporen. Die einfachste Sporengewinnung durch Abspülen befallener Pflanzenteile hat nur eine untergeordnete Bedeutung. In der Regel werden Sporen im Labor auf bestimmten Medien erzeugt. Für viele Pilzarten ist diese Methode erfolgreich und ausreichend, für andere aber versagt sie mehr oder weniger, wie z. B. für den Erreger der Halmbruchkrankheit *Pseudocercospora herpotrichoides*. Experimente mit diesem Pilz belegten, dass durch die Anwesenheit von ausreichender Frischluft in Verbindung mit langwelligem UV-Licht (Leach 1967), tropfbarem Wasser und einer Temperatur von 12°C eine zuverlässige Konidienbildung erreicht werden konnte (Gieffers 1979). Dieser Befund wurde auch später in anderen Versuchen bestätigt (Gieffers et al. 1989). Weitere Untersuchungen führten zum Schluss, dass Sauerstoff als ionisiertes Gas die Sporenbildung entscheidend anregt. In Verbindung mit der Radiationswirkung des UV-Lichtes kann die Sporenbildung weiter erhöht werden. Nachweislich gelang unter diesen Bedingungen eine erhöhte

Sporenbildung der Gattungen *Alternaria*, *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pseudocercospora* und *Verticillium*.

2 Methode

Zur Sporenbildung wurde der Einfluss von Luftsauerstoff, Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid (35%) und ionisiertem Sauerstoff sowie UV-Licht von 350 nm (Osram L18W) im Hauptspektrum untersucht.

Der Anteil ionisierten Sauerstoffs in der Stadtluft ist gering und liegt zwischen 250 und 750 Ionen/cm³. UV-Licht ionisiert molekulare Gase, erhöht also den Anteil des ionisierten Sauerstoffs. Wasserstoffperoxid gibt molekularen Sauerstoff ab, der unter UV-Licht ionisiert wird. Ein elektrisch betriebener Ionisator („Greenair“ von Konovit, 250 000 Ionen/cm³/sec.) erzeugt mittels Hochspannung ständig ionisierten Sauerstoff. Der Anteil von ionisiertem Sauerstoff wird also unter UV-Licht, Wasserstoffperoxid oder durch einen Ionisator erhöht.

Die Experimente fanden in einem Inkubator mit einer Dauertemperatur von 12°C statt. In diesem Temperaturbereich und bei Anwesenheit von Wasser bildeten auch schwer sporulierende Pilze Sporen. Mit diesen Hilfsmitteln und Bedingungen wurde die Sporenbildung von Pilzen an Befallsmaterial, auf Medien in Petrischalen mit Nockendeckeln und in wässriger Suspension untersucht. Die mikroskopische Sporenauszählung erfolgte in Suspensionstropfen von 20 µl.

Abbildung 1 zeigt den Versuchsaufbau in einem Inkubator mit einer UV-Lampe und einer offenen Schale mit

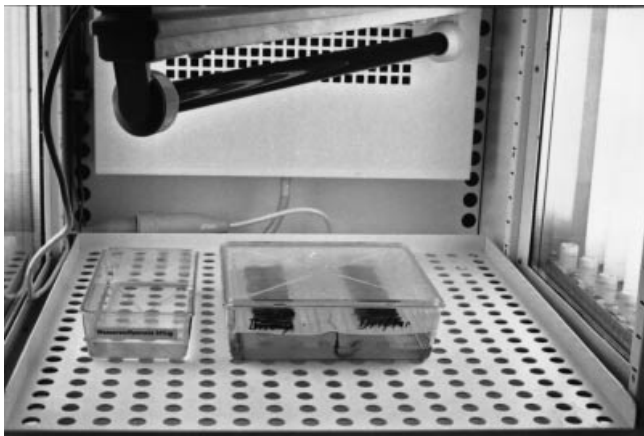


Abb. 1
Inkubator mit langwelligem UV-Licht (350 nm) ca. 20 cm über Weizenhalmen (3 cm) mit natürlichem *Pseudocercospora herpotrichoides*-Befall in einer Bewässerungsbox (rechts). Daneben eine Schale mit Wasserstoffperoxid zur Sauerstoffabgabe.

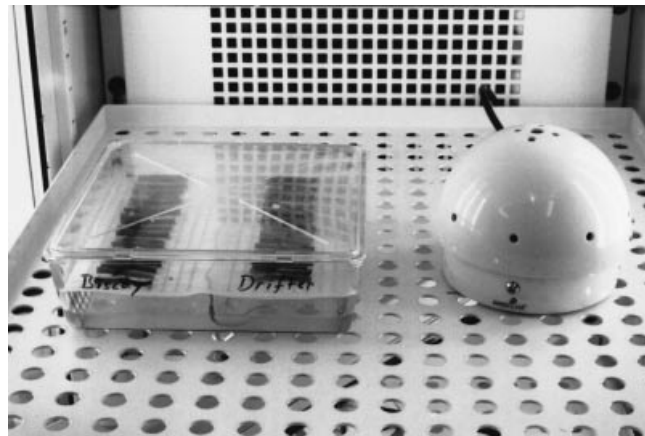


Abb. 2
Inkubator mit Ionisator (rechts) zur technischen Erzeugung von ionisiertem Sauerstoff. Daneben Weizenhalme mit natürlichem *Pseudocercospora herpotrichoides*-Befall in einer Bewässerungsbox.

Wasserstoffperoxid. Zur Sporenbildung an Befallsmaterial (hier Weizenhalme mit Halmbruch) eignet sich eine Bewässerungsbox (Gieffers et al. 1999), die eine ausreichende Wasserversorgung ermöglicht. Für den Sauerstoffzutritt muss die Schale offen bleiben oder mit einem Nockendeckel verschlossen werden, wodurch Sauerstoffzutritt möglich bleibt.

Abbildung 2 zeigt neben der Bewässerungsbox mit halmbruchkranken Weizenhalmen einen Ionisator, der permanent Ionen erzeugt.

3 Ergebnisse

Unter UV-Licht- und Sauerstoffeinfluss (Frischlucht) wurden erste Sporulationserfolge für den Erreger *Pseudocercospora herpotrichoides* erzielt (Gieffers 1979), der

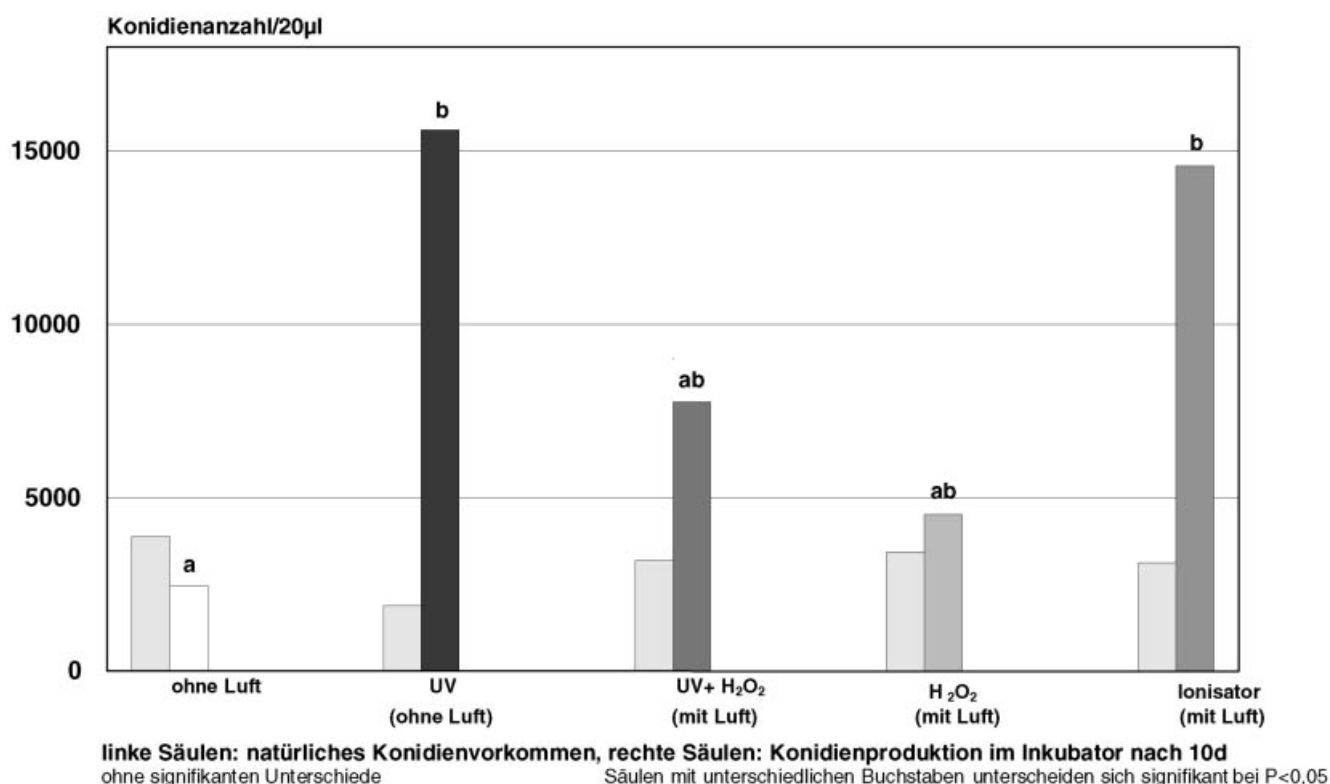


Abb. 3
Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für zehn Tage unter 12°C auf die Konidienbildung von *Pseudocercospora herpotrichoides* an befallenen Weizenblättern (Biscay, Juni 2002) im Vergleich zum natürlichen Konidienvorkommen.

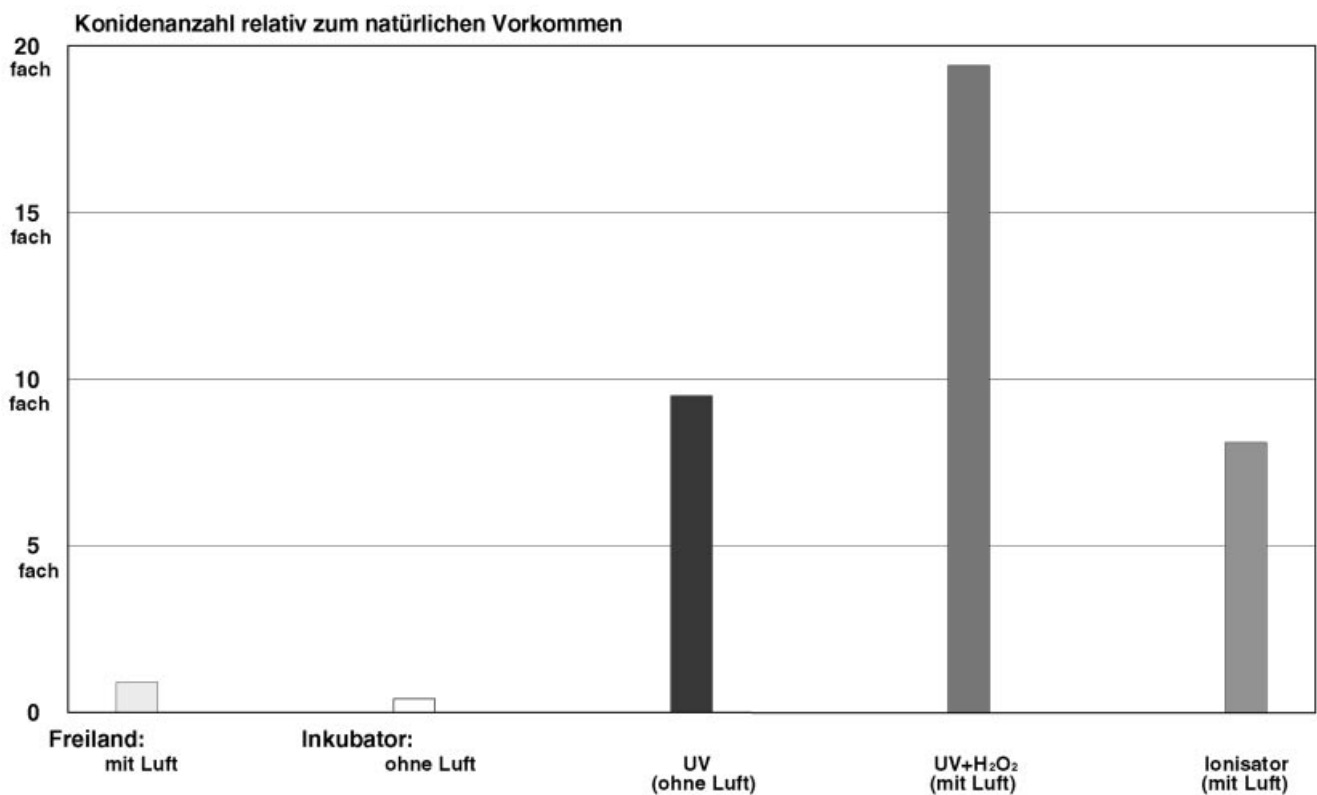


Abb. 4 Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für sechs Tage unter 12°C auf die Konidienbildung von *Pseudocercospora capsellae* an befallenen Rapsblättern (Contact, Juni 2002). Im Vergleich zum natürlichen Vorkommen lag die Konidienbildung unter Laborbedingungen um ein Mehrfaches höher.

ohne diese unterstützenden Maßnahmen auf Medien keine und an natürlich befallenen Material nur wenige Konidien bildete. Neuere Untersuchungen 2002 zeigten hohen natürlichen Konidienbesatz an Befallsblättern des Weizens (Biscay). Nach Konidienabspülung wurde die Sporenbildung unter dem Einfluss von ionisiertem Sauerstoff im Labor untersucht. Für Sporulationstests wurden 2,5 cm lange Blattstücke mit Läsionen vom Juni 2002 (Abb. 3) in fünf gleichbreite Längsstreifen geschnitten. Das durch Abspülung ermittelte natürliche Konidienvorkommen (linke Säule) war erwartungsgemäß relativ einheitlich. Konidienfreies Material bildete unter UV-Licht, UV-Licht kombiniert mit Wasserstoffperoxid oder unter dem Ionisator hohe Konidienmengen.

An Raps (Contact, Juni 2002) wurde an untersten nekrotischen Blättern *Pseudocercospora capsellae* gefunden. Von 2 cm-Blattscheiben wurden die abgespülten Konidien gezählt. Am nun konidienfreien Material wurde die erneute Sporenbildung untersucht (Abb. 4). Die Konidienneubildung erhöhte sich unter Luftabschluss und Frischluftzufuhr nur gering. Dagegen wurde unter UV-Licht, UV-Licht und Wasserstoffperoxid oder unter dem Ionisator das natürliche Konidienvorkommen mehrfach übertroffen.

Die Konidienbildung von *Alternaria brassicae* und *Botrytis cinerea* wurde auf Nährböden unter den verschiedenen Sauerstoffbedingungen untersucht. Wie aus Abbildung 5 zu ersehen ist, hatte das UV-Licht keinen positiven Einfluss auf die Sporenbildung von *A. brassicae* und *B. cinerea* im Vergleich zur Kultur in einer geschlossenen Petrischale („ohne Luft“). Dagegen erhöhten die anderen Maßnahmen zur Anreicherung des ionisierten Sauerstoffs deutlich die Konidienproduktion.

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob auch für andere Pilzgattungen, die unter üblichen Laborbedingungen auf Nährböden ausreichend Sporen bilden, ein sporulationsfördernder Einfluss von ionisiertem Sauerstoff nachweisbar sei.

Verticillium albo-atrum (Abb. 6) reagierte auch unter UV-Licht mit einer erhöhten Konidienerzeugung. Dagegen bildete *V. longisporum* nur unter dem Ionisator höchste Konidienmengen.

Experimente von 1996 mit wässrigen Sporangiensuspensionen von *Phytophthora infestans* zeigten (Abb. 7), dass der Zoosporenschlupf unter Luftzufuhr etwas höher war als unter Luftabschluss. UV-Licht zeigte einen gewissen Einfluss auf die Erhöhung der Zoosporenschlupfrate. Höchste Zoosporen Mengen wurden unter UV-Licht und

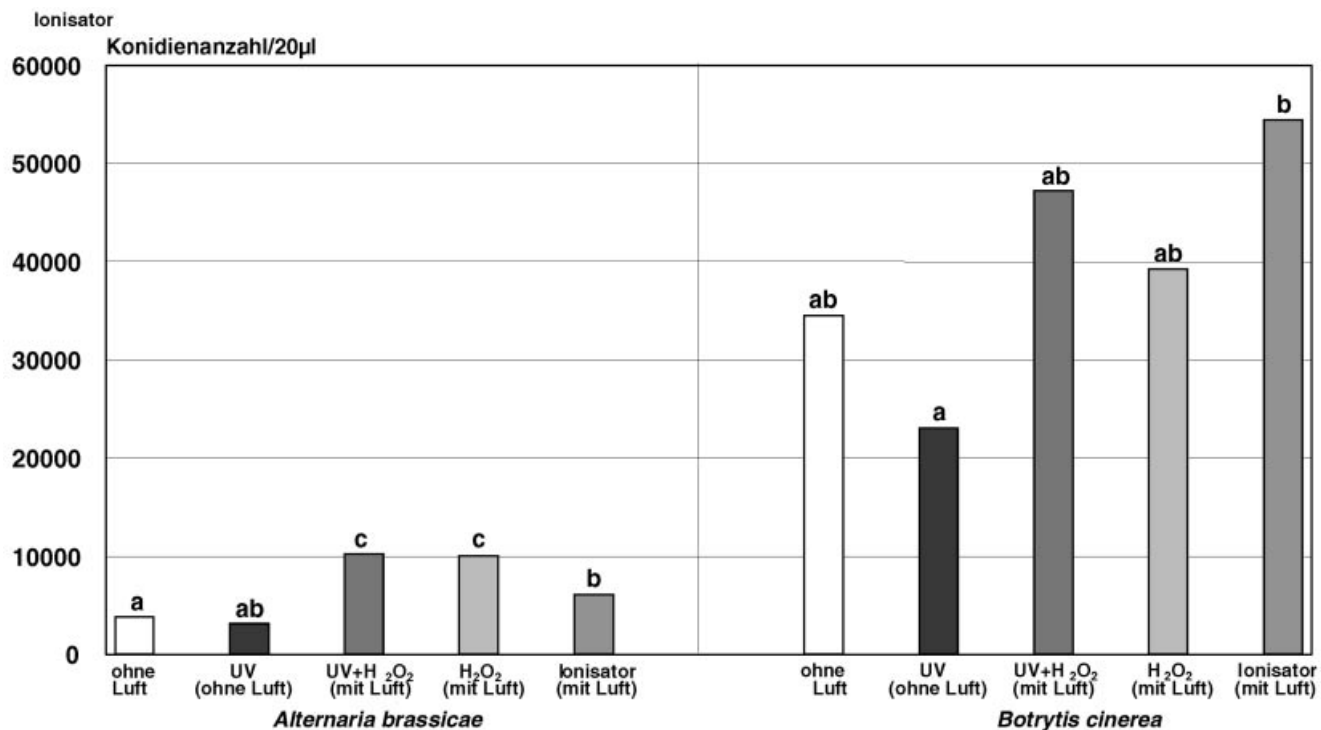


Abb. 5
Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für sechs Tage unter 12°C auf die Konidienbildung von *Alternaria brassicae* und *Botrytis cinerea* auf PDA (Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei $P < 0,05$).

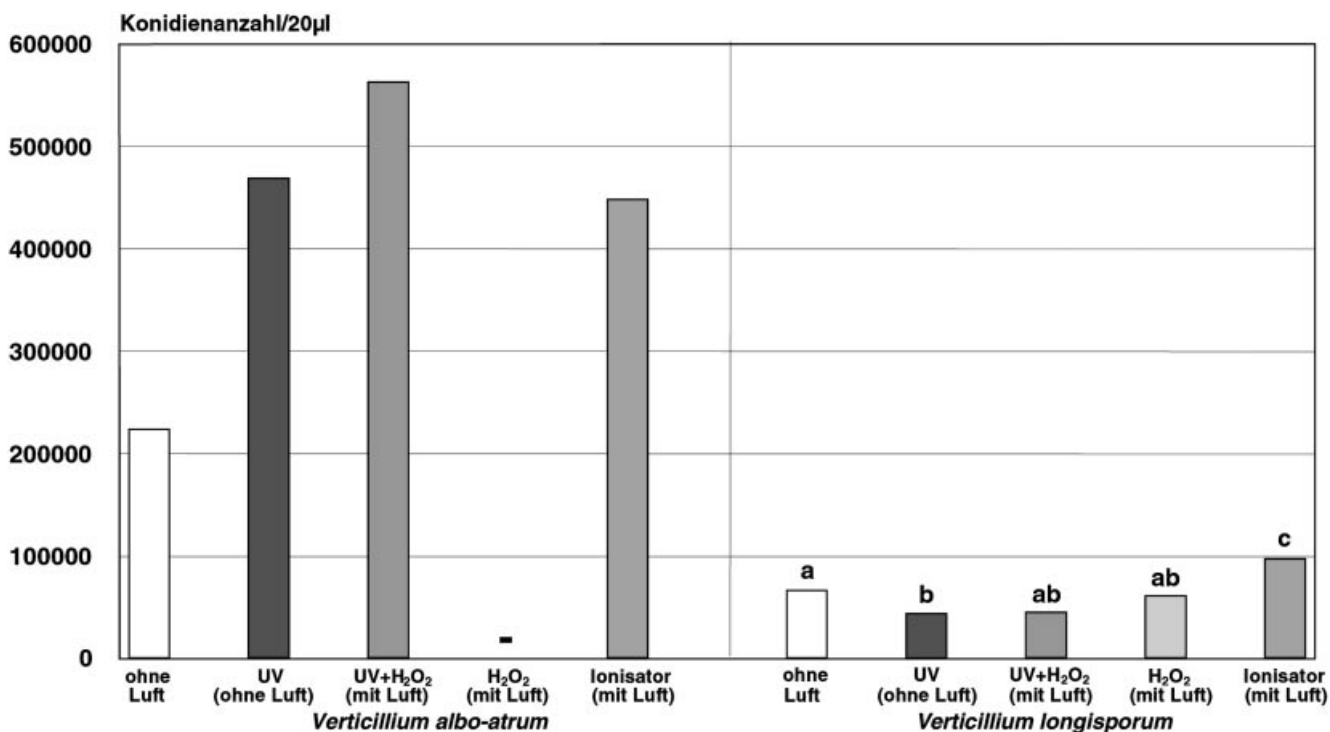


Abb. 6
Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für sechs Tage unter 12°C auf die Konidienbildung von *Verticillium albo-atrum* und *V. longisporum* auf PDA (Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei $P < 0,05$).

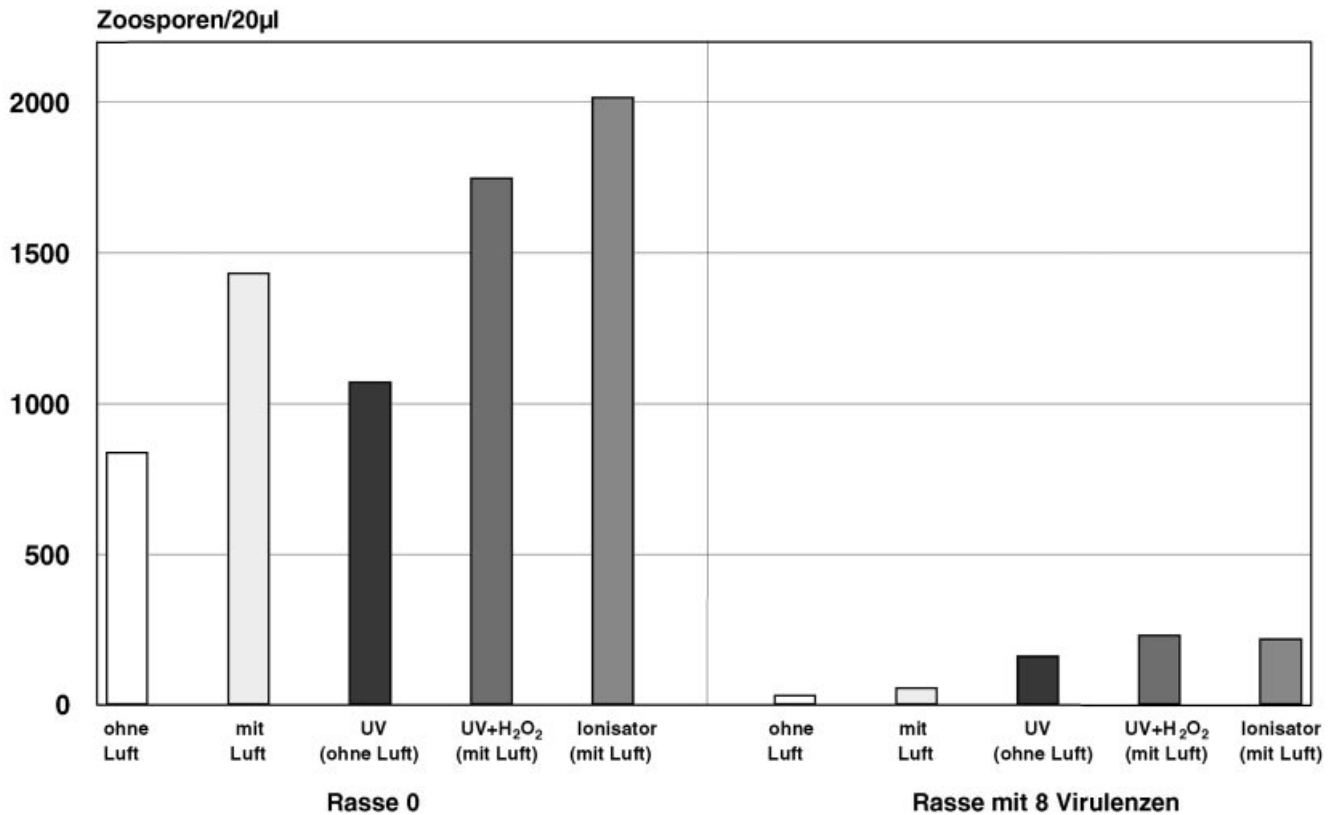


Abb. 7

Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für sechs Stunden unter 12°C auf die Zoosporenbildung von zwei *Phytophthora infestans*-Rassen.

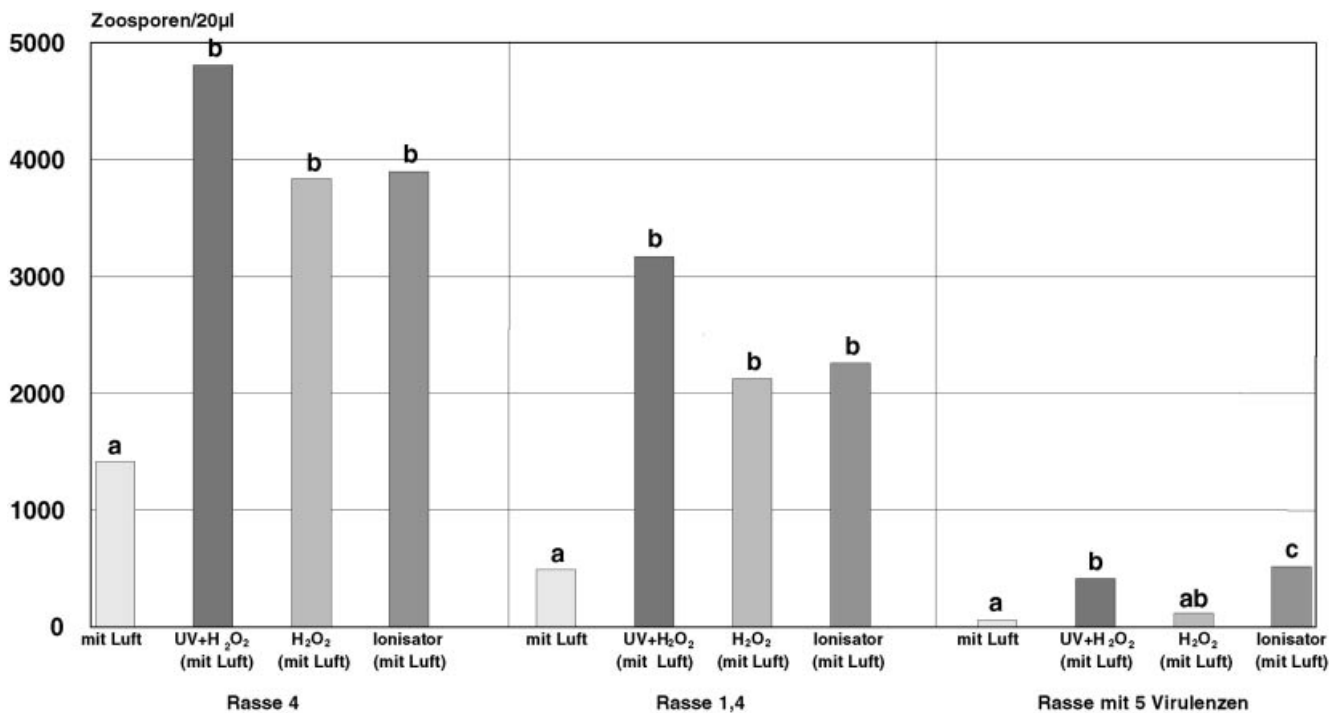


Abb. 8

Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht für acht Stunden unter 12°C auf die Zoosporenbildung von drei *Phytophthora infestans*-Rassen (Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei $P < 0,05$).

Tabelle 1

Sporenanzahl geordnet nach Rängen und die Mittel der Ränge

Pathogen	ohne Luft	mit Luft	UV-Licht	UV-Licht + H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	Ionisator
<i>Pseudocercospora</i>						
<i>herpotrichoides</i> (Abb. 3)	1	–	5	3	2	4
<i>Pseudocercospora capsellae</i> (Abb. 4)	1	2	4	5	–	3
<i>Alternaria brassicae</i> (Abb. 5)	2	–	1	5	4	3
<i>Botrytis cinerea</i> (Abb. 5)	2	–	1	4	3	5
<i>Verticillium albo-atrum</i> (Abb. 6)	1	–	3	4	–	2
<i>Verticillium longisporum</i> (Abb. 6)	4	–	1	2	3	5
<i>Phytophthora infestans</i> :						
Rasse 0 (Abb. 7)	1	3	2	4	–	5
Rasse mit 8 Virulenzgenen (Abb. 7)	1	2	3	5	–	4
Rasse 4 (Abb. 8)	–	1	–	4	2	3
Rasse 1,4 (Abb. 8)	–	1	–	4	2	3
Rasse mit 5 Virulenzgenen (Abb. 8)	–	1	–	3	2	4
Rangsumme	13	10	20	43	18	41
Mittel	1,6	1,7	2,5	3,9	2,6	3,7

Wasserstoffperoxid und unter Ionisatoreinwirkung erzielt. Neuere Untersuchungen bestätigten die fördernde Wirkung von ionisiertem Sauerstoff auf den Zoosporenschlupf. Wie Abbildung 8 erkennen lässt, bildeten sich bei allen Rassen unter ionisiertem Sauerstoff signifikant mehr Zoosporen als unter üblicher Raumluft.

4 Diskussion

Die Daten der Abbildungen 3 bis 8 wurden nach Rängen geordnet und in Tabelle 1 zu einer vergleichenden Übersicht zusammengestellt. Die Sporenbildung der untersuchten fünf Pilzgattungen war unter Luftabschluss wie unter Luftzufuhr am geringsten. UV-Licht führte bei einigen Arten zur Erhöhung, bei anderen zur Reduktion der Sporenbildung. Wasserstoffperoxid, ionisiert durch UV-Licht, erhöhte die Sporenproduktion. Unter dem Einfluss von UV-Licht kombiniert mit Wasserstoffperoxid oder unter Ionisatoreinwirkung wurden höchste Sporen Mengen gebildet. *P. herpotrichoides* bildete nur unter diesen Bedingungen zuverlässig hohe Konidienmengen. Die untersuchten Pilzarten aus der Gattung *Verticillium* unterschieden sich durch ihre entgegengesetzte Konidienbildung. Während *V. albo-atrum* unter UV-Licht und Wasserstoffperoxid höchste, unter Ionisatoreinfluss aber nur geringe Konidienmengen erzeugte, so reagierte *V. longisporum* diametral dazu.

Die Experimente belegen, dass hohe Mengen ionisierten Sauerstoffs die Entstehung hoher Sporen Mengen bewirken. Inwieweit allein die Radiation des UV-Lichts zu einer erhöhten Sporenbildung führt, konnte mit diesen Experimenten nicht sicher ermittelt werden. In Verbindung mit ionisiertem Sauerstoff führte UV-Licht zu hohen Sporen Mengen, so dass ein sporulationsfördernder Ein-

fluss des UV-Lichts in dieser Kombination nachweislich besteht. Ein additiver Effekt beider Komponenten wurde nicht beobachtet, wohl aber war die Kombinationswirkung beider Komponenten größer als ihre Einzelwirkung.

Die Bildung großer Sporen Mengen unter Ionisatoreinfluss wird in der permanenten Erzeugung sehr hoher Mengen von Sauerstoffionen gesehen.

Trotz wiederholter Experimente und langjähriger Erfahrung konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob bestimmte Pilzarten unter dem Einfluss von UV-Licht und Wasserstoffperoxid oder unter Ionisatoreinfluss höhere Sporen Mengen erzeugen.

5 Literatur

- Gieffers, W. (1979): Methodik der Resistenzprüfung gegen den Erreger der Halmbruchkrankheit (*Pseudocercospora herpotrichoides*) (Fron) Deighton an Winterroggen. Diss. Universität Rostock, S.134.
- Gieffers, W., V. H. Paul & E. Ritter (1989): Der Einfluss von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, Merkmale zur Morphologie des Erregers und dessen Nachweis an Dikotyledonen. *Phytopathologie* **126**, 115–132.
- Gieffers, W. & M. Fladung (1999): Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Texte Umweltbundesamt, Freisetzung transgener Gehölze Stand, Probleme, Perspektiven, Berlin, 92–97.
- Leach, C. M. (1967): Interaction of near-ultraviolet light and temperature of sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, and *Stemphylium*. *Can. J. Botany* **45**, 1999–2016.

Anschrift des Verfassers: Dr. Werner Josef Gieffers, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln, Arbeitsgruppe Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, E-Mail: gieffers@mpiz-koeln.mpg.de