

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung, Müncheberg, Mark.)

Untersuchungen zur Züchtung von kleekrebsresistenten Kleearten und Luzerne.

Ausarbeitung von Infektionsmethoden. Vorläufige Mitteilung.

Von **W. Rudolf.**

Die Gattung *Sclerotinia* enthält eine Reihe von Arten, die als Schädlinge unserer Kulturpflanzen eine große Beachtung verdienen. Es handelt sich um fakultative Parasiten, die außerdem meist polyvor sind, d. h. auf mehreren Arten von Wirtspflanzen, die nicht einmal miteinander verwandt zu sein brauchen, parasitieren können. Eine Bekämpfung dieser Parasiten auf dem Wege der Resistenzzüchtung verspricht daher zunächst wenig Aussichten. Es liegen aber Beobachtungen vor, daß Resistenz gegen *Sclerotinia*-Parasiten in der Natur vorkommt. So sind allgemein die Süßkirschensorten gegen *Sclerotinia cinerea* SCHROET., die Moniliakrankheit der Kirsche, bedeutend widerstandsfähiger als die Sauerkirschen, und unter den Süßkirschen zeigen einige Sorten eine höhere Resistenz als andere. Beim Kleekrebs, *Sclerotinia ciboroides* (HOFFM.) ERIKS. (= *Sclerotinia trifoliorum* ERIKS.) sind in Svalöf durch N. SYLVÉN und G. NILSSON-LEISSNER umfangreiche Untersuchungen durchgeführt worden, wobei, wie NILSSON-EHLE 1934 auf der Tagung der Deutschen Naturforscher und Ärzte in Hannover berichtet hat, resistente Kleestämme ausgelesen werden konnten. Die beiden schwedischen Forscher haben in der Resistenzzüchtung eine Feldinfektion verwendet, indem sie die Prüfung von Kleestämmen auf Parzellen vornahmen, die mit Sklerotien stark verseucht wurden. Eine Methode künstlicher Infektion für Gewächshäuser haben sie nicht ausgearbeitet. Auch im Gewächshaus verwandten sie für die Infektion Sklerotien, welche Apothezien bildeten und mit den herausgeschleuderten Ascosporen die Wirtspflanzen von Rotklee, Alsikeklee und Weißklee infizierten. Infektionsversuche mit Sporen im großen Maßstabe mißlang.

Bei der großen Bedeutung dieses Schädlings für den deutschen Klee- und Luzerneanbau entschloß ich mich 1934 in Leipzig, die Resistenzzüchtung gegen *Sclerotinia trifoliorum* zu bearbeiten. Die ersten Untersuchungen wurden von Dr. NOLL und Studienassessor FÖRSTER durch-

geführt. Die Arbeiten wurden dann in Müncheberg fortgesetzt¹.

Künstliche Infektionsmethoden.

Der Pilz, *Sclerotinia trifoliorum*, läßt sich auf den verschiedensten Substraten kultivieren, so auf gekochten oder gedämpften Teltower Rübchen, Wruken, Möhren, roten Beeten, Zwiebeln, auf rohen Tomaten, weniger gut auf Birnen, Äpfeln, Pflaumen und Bananen. Von künstlichen Nährböden hat sich besonders Traubenzucker-Pepton-Agar nach HENNEBERG bewährt².

Die Entwicklung des Parasiten verläuft auf den genannten Nährböden sehr verschieden. Auf *Henneberg-Agar* in Petrischalen erhält man,



Abb. 1. Henneberg-Agar-Kultur v. *ScI trif.*, Herkunft Weißenstephan. Mycel aus natürlichen Sklerotien. Geimpft: 27. Januar 1937. Aufnahme: 24. Februar 1937.

wenn man die Impfung mit kleinen Mycelbröckchen aus dem Innern von natürlichen, kranken Pflanzen entstammenden Sklerotien

¹ Ich danke noch ihnen beiden sowie Herrn Dr. ÅKERBERG, Weibullsholm, der als wissenschaftlicher Gast des Instituts sich im Jahre 1936 an diesen Arbeiten beteiligt hat, und Fräulein WALLRABE, die diese Untersuchungen dauernd betreut.

² Zusammensetzung:

Pepton „Witte“	1,0 g
Saures phosphorsaures Ammonium	0,2 g
Salpetersaures Kalium	0,2 g
Schwefelsaures Magnesium	0,05 g
Chlorcalcium	0,01 g
Traubenzucker	10,0 g
Aqua dest.	100,0 g
Agar	2—3,5 g

vornimmt, zunächst Mycel, das in konzentrischer Anordnung nach etwa 10 Tagen Sklerotien bildet. Diese Sklerotien können unter bestimmten Bedingungen zur Bildung von Apothecien

Sklerotien lassen sich Morphotypen beobachten, wie Abb. 1—7 zeigen.

Werden *Tomaten* mit kleinen Stücken aus dem Inneren von Sklerotien infiziert, so wird das

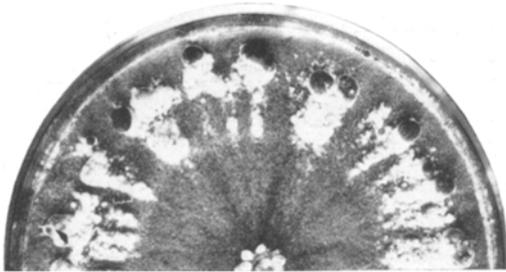


Abb. 2. Henneberg-Agar-Kultur v. *Scl. trif.*, Herkunft Rostock. Mycel aus natürlichen Sklerotien. Geimpft: 27. Januar 1937. Aufnahme: 24. Februar 1937.

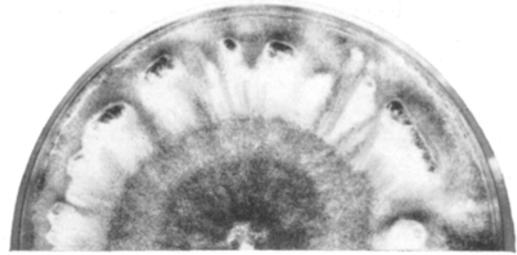


Abb. 5. Einsporkultur, Herkunft Leipzig auf Henneberg-Agar. Geimpft: 3. Februar 1937. Aufnahme: 24. Februar 1937.

gebracht werden, welche normale Asci enthalten und lebensfähige Ascosporen ausschleudern. Von Einsporkulturen ausgehend, erhält man auf

ganze Innere vom Mycel des Parasiten durchwuchert. Im Inneren der Tomaten tritt keine Sklerotienbildung ein, wohl aber an allen Stellen,

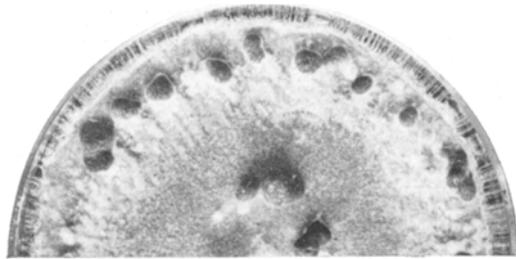


Abb. 3. Henneberg-Agar-Kultur von *Scl. trif.*, Herkunft Weibullsholm. Mycel aus natürlichen Sklerotien. Geimpft: 27. Januar 1937. Aufnahme: 24. Februar 1937.

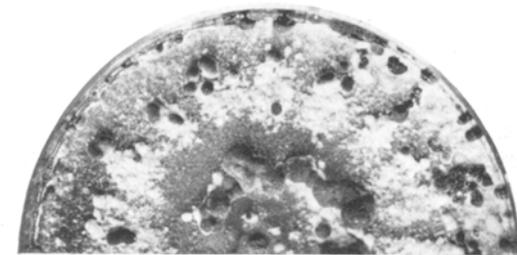


Abb. 6. Einsporkultur, Herkunft Weihestephan, auf Henneberg-Agar. Geimpft: 15. Februar 1937. Aufnahme: 3. März 1937.

demselben Substrat Mycel, das in derselben Weise wie das Mycel aus natürlichen Sklerotien von kranken Pflanzen wieder Sklerotien bildet.

wo das Mycel mit der Luft in Berührung kommt. Das Mycel kann aus der Tomatenpülpe leicht gewonnen werden und läßt sich zur Infektion

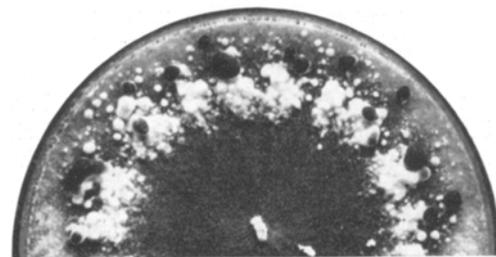


Abb. 4. Einsporkultur Herkunft Landsberg, aus Henneberg-Agar. Geimpft: 3. Februar 1937. Aufnahme 24. Februar 1937.

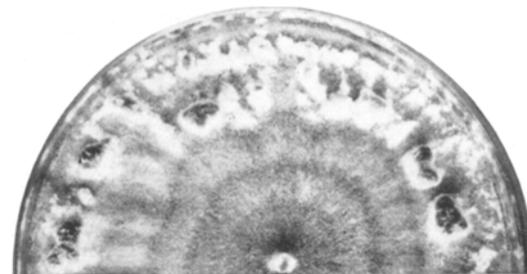


Abb. 7. Einsporkultur, Herkunft Weihestephan, auf Henneberg-Agar. Geimpft: 27. Januar 1937. Aufnahme: 24. Februar 1937.

Bei den Sklerotien aus Einsporkulturen konnte bislang nur die Bildung von Stielchen der Apothecien, nicht aber die Bildung von Asci beobachtet werden; dagegen bilden solche Sklerotien Konidien. Bei Einsporkulturen sowohl wie bei Kultur mit Mycelstückchen aus natürlichen

von Kleepflanzen sehr gut verwenden.

Weitere Versuche zeigten, daß der Pilz sich sehr gut auf mit *Pflaumensaft getränkten Brötchen* kultivieren läßt (Abb. 8). Die Brötchen mit etwa 50 ccm Pflaumensaft werden in besonderen Glasgefäßen mit Deckel, welche mit einer kreis-

runden Impföffnung von etwa 1,2 cm Durchmesser versehen sind und mit einem Wattebausch verschlossen werden können, sterilisiert, und die Impfung wird mit Mycel von künstlichen Kulturen oder aus natürlichen Sklerotien durchgeführt. Zunächst bildet sich Mycel, welches das Brötchen durchwuchert und an der Oberfläche einen dichten Rasen bildet. Nach etwa 14 bis 20 Tagen bilden sich die ersten Sklerotien, und nach 5—6 Wochen ist das ganze Brötchen mit Sklerotien durchsetzt. Neben den Sklerotien entwickelt sich in dem Pflaumensaft viel Mycel, das eine dichte, gummiartige feste Masse bildet. Wenn die meisten Sklerotien hart geworden sind, werden die Gefäße entleert und die Sklerotien sowie das Mycel bei Zimmertemperatur getrocknet. Auch diese Sklerotien bilden unter geeigneten Bedingungen Apothezien und Ascosporen. Der Pilz durchläuft also auch bei dieser Kultur alle Entwicklungsphasen. An Stelle von Pflaumensaft läßt sich ein Dekokt aus Kleeblättern und Wasser im Verhältnis 1:5 verwenden, der zwei Stunden auf 50° C erhitzt wird. Nach 5—6stündigem Stehen wird filtriert und eine Viertelstunde bei 1 atm. sterilisiert. Die Sterilisierung und Impfung der mit Kleedekokt getränkten Brötchen geschieht in der schon angegebenen Weise.

Bei der *Entwicklung einer Infektionsmethode für Sclerotinia trifoliorum* war die Überlegung maßgebend, daß der Infektionsstoff des Pilzes sich jederzeit im Laboratorium in großen Massen erzeugen ließ und daß mit diesem Impfstoff eine sichere Infektion erreicht wurde. Wir konnten Kleepflanzen mit *Ascosporen* infizieren, die durch ein Deckgläschen über den Apothezien aufgefangen wurden. Die Ascosporen wurden in einer Aufschwemmung von mit Wasser verdünntem Kleedekokt auf die Pflanzen zerstäubt. Die Gewinnung von Ascosporen in großen Mengen bereitet aber Schwierigkeiten, so daß sie als Infektionsstoff normalerweise ausscheiden. Hinzu kommt, daß es bislang noch nicht restlos gelungen ist, die Keimung der Sklerotien völlig willkürlich zu regeln. Wechsel von Feuchtigkeit und Trockenheit und Temperaturen von 12 bis 16° C fördern die Bildung der Apothezien. Auch Wechseltemperaturen (nachts 5° C, tags 20° C) erwiesen sich als günstig. Trotzdem bleibt die Keimung launisch. Die Ausbildung der Scheiben mit den Asci und Sporen erfolgt nur bei Licht, nicht in Dunkelheit. Auffällig ist der Phototropismus der Apothezien (NOLL).

An infizierten Kleepflanzen bildet sich bei hoher Luftfeuchtigkeit *Luftmycel*, an dem in reichem Maße Konidien abgesondert werden (Abb. 9). Auch mit diesen *Konidien* sind Klee-



Abb. 8. Pflaumensaft-Brötchen, mit Herkunft Leipzig am 1. Februar 1937 geimpft. Durchmesser der Glasschale 12,5 cm, Höhe 7,0 cm.

pflanzen infiziert worden. Mit den Konidien wurde in Wasser, dem 2% Traubenzucker und nur 0,1% Agar zugesetzt wurden, eine Auf-



Abb. 9. Konidienbildung auf Kleeblättern. Aufnahme: 3. Mai 1937.

schwemmung hergestellt, welche sich bequem auf die Kleepflanzen zerstäuben läßt. Diese Konidien lassen sich in großen Mengen erzeugen, wenn man infizierte Blätter in mit feuchtem Fließpapier ausgelegten Petrischalen aufbewahrt.

Immerhin ist die Gewinnung von Konidien auf diese Weise umständlich und hängt von dem Vorhandensein infizierter Blätter ab.

Konidienbildung tritt auch auf Kulturen auf Henneberg-Agar ein, wenn sie überständig und



Abb. 10. Fränkischer Rotklee, mit Konidienaufschwemmung Herkunft Weibullsholm am 6. April 1937 infiziert (linker Topf nicht infiziert). Aufnahme 3. Mai 1937.

trocken werden oder die Platten zu dünn gegossen sind. In diesen Fällen kommt es nicht mehr zu Sklerotienbildung, sondern aus Nährstoff- oder Feuchtigkeitsmangel zur Konidienbildung. Auch mit diesen Konidien konnte die



Abb. 11. Gewächshausabteil mit infizierten Kleepflanzen unter Gaskästen.

Infektion von Kleepflanzen erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 10).

Wenn frische *Tomaten* zur Verfügung stehen, läßt sich *Mycel des Pilzes*, wie schon gesagt, in großen Mengen im Inneren der Tomaten erzeugen. Die vollständig durchwucherten Tomaten werden durch einen Fleischwolf gedreht und die gewonnene Masse durch ein feines Sieb gerührt, um Schalenteile und Samen zu entfernen.

Der Tomatensaft mit dem Mycel läßt sich mehrere Wochen in einem dicht abgeschlossenen Glasgefäß bei 0—1° C aufbewahren, wird aber am besten sofort nach der Gewinnung für die Infektion verwendet. Man setzt der Mycelmasse etwas Wasser mit Agar zu und spritzt ihn auf die Kleepflanzen. Die Verwendung von Tomaten, welche mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt worden waren, bereitete unerwarteterweise Schwierigkeiten, die noch nicht aufgeklärt sind.

Die bequemste Infektionsmethode ist die folgende, die zur Zeit allein für Masseninfektionen angewendet wird:

Von den verschiedenen Herkünften von *Sclerotinia trifoliorum* werden in der angegebenen Weise auf mit *Pflaumensaft* oder *Kleedekokt* getränkten Brötchen Sklerotien in

großer Zahl erzeugt und lufttrocken gemacht. Sie werden dann zerkleinert und auf einer geeigneten Mühle zu feinem grauen Mehl zermahlen. Dieses Mehl kann nach bisherigen Beobachtungen trocken über ein Jahr lang aufbewahrt werden und behält dabei seine Lebensfähigkeit. Der Infektionsstoff wird als Suspension mit 100 g Wasser, 0,5 g Sklerotienmehl, 2 g Traubenzucker und 0,25 g Agar hergestellt. Nachdem der Agar in der Traubenzuckerlösung durch Erhitzen im Dampftopf oder Autoklaven zur Lösung gebracht wurde, wird nach Abkühlen das Sklerotienmehl zugesetzt. Diese Suspension wird dann wieder mit Hilfe eines Zerstäubers auf die Kleepflanzen gespritzt. Wir rechnen auf je 50 Kleepflanzen ungefähr 50 ccm Infektionsaufschwemmung.

Infektionsbedingungen.

Das Alter der Pflanzen.

Kleepflanzen im Keimstadium werden nach bisherigen Ergebnissen restlos vernichtet. Um resistente Pflanzen finden zu können, wird die Infektion durchgeführt, wenn sie etwa 15—20 cm hoch sind und wenigstens 5—6 Blätter entwickelt haben.

Temperatur. Der Erfolg der Infektion ist am größten, wenn die Temperatur etwa 13—16° C beträgt. Bei niedrigeren und höheren Temperaturen verläuft die Infektion sehr langsam.

Luftfeuchtigkeit. Die relative Luftfeuchtigkeit soll möglichst 100% betragen. Taubildung fördert den Befall sehr stark. Auch fein zerstäubtes Wasser, das nach erfolgter Infektion beim Auftreten der ersten braunen Fleckchen auf den Blättern den Pflanzen zugeführt wird, wirkt sich sehr günstig auf die Ausbreitung des Pilzes aus.

Licht. Direkte Sonnenbestrahlung hemmt den Befall; ob mittelbar über die Temperaturerhöhung oder unmittelbar ist noch nicht bekannt. Am günstigsten ist diffuses Licht, bei dem die Kleepflanzen auch unter Glaskästen möglichst nicht vergeilen.

Zur Infektion werden die zu prüfenden Kleeherkünfte oder Stämme in Saatschalen ausgesät und dann in Triebkästen auf 5×5 cm pikiert. Wenn die Kleepflanzen das beschriebene Entwicklungsstadium erreicht haben, werden die Triebkästen in ein Gewächshausabteil gebracht, das die notwendigen Temperatur- und Lichtbedingungen erfüllt. Nach erfolgter Infektion werden die Triebkästen in feuchten Torfmull gestellt und Glaskästen darübergestülpt (Abb. 11). Der Klee bleibt unter diesen Kästen, bis die anfälligen Pflanzen vernichtet sind. Je nach den Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen dauert das 3—6 Wochen. Die Infektion ist bereits meist am dritten Tag an punktförmigen, graubraunen Flecken auf den Blättern zu erkennen, die schnell an Größe zunehmen, bis die ganze Blattfläche vernichtet ist (Abb. 12). Das Mycel durchwuchert auch die Stengel bis zum Wurzelhals und bei genügend hoher Luftfeuchtigkeit wird reichlich Luftmycel mit großen Mengen Konidien gebildet. Die Infektion kann nach den bisherigen Erfahrungen auch durch Berühren kranker Pflanzenteile mit gesunden stattfinden. Ist nach 3 Tagen ein Befallsbeginn noch nicht festzustellen, so wird die Infektion wiederholt.

Kleepflanzen, welche bei gut gelungener Infektion nicht absterben und gut regenerieren, können in einzelnen Rotkleeherkünften und Sorten beobachtet werden. An diesen Pflanzen, die die erfolgte Infektion klar erkennen ließen, konnten kleine Sklerotien im Wurzelhals eben über der Erde gefunden werden. Auch an dem Stengel der vom Kleekrebs vollständig vernichteten Pflanzen ist Sklerotienbildung festzustellen. Bevor wir Kleepflanzen als resistent betrachten, wird die Infektion mit derselben

Herkunft des Pilzes dreimal durchgeführt. Bisher konnten resistente Kleepflanzen in folgenden Sorten und Herkünften gefunden werden: Lembkes, Fränkischer, Schlesischer, Dregers Böhmischer zweischüriger, Merkur, Ultuna und Tystofte Nr. 40, die eine dreimalige Infektion mit der Herkunft Landsberg a. W. des Pilzes durchhielten. Wenn auch fast alle Blätter und Stengel vernichtet wurden, trieben die Pflanzen immer wieder kräftig aus, während bei den anfälligen auch Herzblätter und Wurzelhals abstarben. Die meisten Rotkleeherkünfte und Sorten werden jedoch von dem Pilz restlos vernichtet.

Das Vorkommen von Biotypen konnte bei *Sclerotinia trifoliorum* noch nicht nachgewiesen

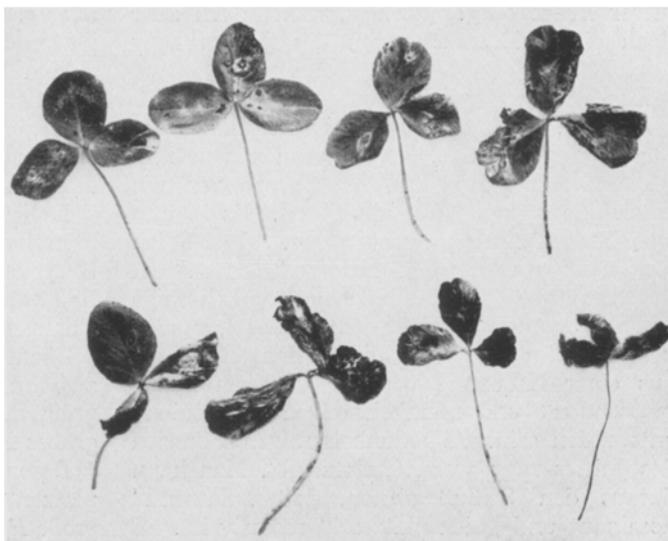


Abb. 12. Kleeblätter in steigenden Befallstadien. Infektion: 28. August 1937. Aufnahme 9. September 1937.

werden, wohl aber das Vorkommen von Morphotypen bei Einsporkulturen und Pilzherkünften aus Henneberg-Agar.

Literatur (nicht vollständig).

- SORAUER, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, II. Bd., I. Teil. Abhandl. von Noack 1928.
- NILSSON-LEISSNER, A. G., u. N. SYLVÉN: Studier över klöverrötan (*Sclerotinia trifoliorum*). Sveriges Utsädesförenings Tidskrift 1929, 130—158.
- NILSSON-LEISSNER, A. G.: Om klöverrötans (*Sclerotinia trifoliorum* ERIKSS.) uthallighet i mark och nagra mya värdväxter för densamma. Sveriges Utsädesförenings Tidskrift 1934, 322.
- NILSSON-EHLE, H.: Züchtungsforschung im Dienste der Landwirtschaft. (Vortrag auf der 93. Versammlung der Naturforscher und Ärzte in Hannover 1934.) Naturwiss. 1935, Heft 17.
- SCHMIDT, M.: Infektionsversuche mit *Sclerotinia cinerea* an Süß- und Sauerkirschen. Gartenbauwiss. 1937, 167.