

Lehrstuhl für Phytopathologie  
der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Epidemiologie des Falschen Mehltaus  
(*Peronospora farinosa* Fr. (Fr.) f. sp. *spinaciae* Byford) an Spinat  
als Grundlage für die Entwicklung eines Prognosemodells**

Birte Deil

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. V. Zinkernagel, i. R.
2. Univ.-Prof. Dr. W. Schnitzler

Die Dissertation wurde am 01.09.03 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am 23.10.03 angenommen.

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	2
2.	LITERATURÜBERBLICK.....	5
3.	MATERIAL UND METHODEN .....	19
3.1.	BEGRIFFSBESTIMMUNG .....	19
3.2.	DATENERHEBUNG WACHSTUMSMODELL SPINAT .....	21
3.3.	PATHOGENESE UNTER KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN .....	22
3.3.1.	<i>Pflanzenanzucht</i> .....	22
3.3.2.	<i>Erregerkultur</i> .....	22
3.3.3.	<i>Versuchsbedingungen der Infektionsversuche</i> .....	23
3.3.3.1.	Einfluß von Inokulumkonzentration auf die Befallsstärke und die Latenz .....	23
3.3.3.2.	Infektion .....	24
3.3.3.2.1.	Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur.....	24
3.3.3.2.2.	Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer .....	24
3.3.3.2.3.	Infektion in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer .....	24
3.3.3.3.	Dauer der Latenz.....	24
3.3.3.3.1.	Inkubations- und Latenzperiode in Abhängigkeit von der Temperatur und der Inokulumkonzentration.....	24
3.3.3.3.2.	Latenzperiode in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.....	25
3.3.3.4.	Sporulationsintensität .....	25
3.3.3.4.1.	Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit.....	25
3.3.3.4.2.	Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Strahlung .....	26
3.3.3.4.3.	Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur .....	26
3.3.3.5.	Vitalität der Sporangien .....	27
3.3.3.5.1.	Sporangienvitalität in Abhängigkeit von der Temperatur .....	27
3.3.3.5.2.	Sporangienvitalität in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.....	27
3.4.	PATHOGENESE UNTER FREILANDBEDINGUNGEN .....	28
3.4.1.	<i>Pflanzenanzucht</i> .....	28
3.4.2.	<i>Versuchsdurchführung</i> .....	28
3.5.	BONITUR DES BEFALLS .....	29
3.5.1.	<i>Bonitur der Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen</i> .....	29
3.5.2.	<i>Bonitur der Freilandversuche</i> .....	30
3.6.	WIRT/PATHOGEN-INTERAKTION.....	31
3.6.1.	<i>Anfälligkeit in Abhängigkeit von Alter und Wachstumsstadium der Wirtspflanzen</i> .....	31
3.6.2.	<i>Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese</i> .....	32
3.6.2.1.	Gaswechselkammer .....	32
3.6.2.2.	Versuchsdurchführung.....	32
3.7.	RASSENBESTIMMUNG.....	33
3.7.1.	<i>Untersuchte Isolate</i> .....	33
3.7.2.	<i>Infektionsversuche</i> .....	35
3.7.3.	<i>Optimierung der RAPD- Methodik für Peronospora farinosa f. sp. spinaciae</i> .....	36

3.7.3.1.	Produktion von Sporangienmaterial.....	36
3.7.3.2.	Vorbereitung der DNA .....	37
3.7.3.3.	DNA Extraktion .....	37
3.7.3.4.	Vergleich der Mengen an extrahierter pilzlicher DNA.....	38
3.7.3.5.	RNA-Verdau.....	39
3.7.3.6.	Optimale DNA-Konzentration für PCR.....	39
3.7.3.7.	Verwendete Primer.....	40
3.7.3.8.	PCR- Bedingungen.....	40
3.7.3.9.	Gelelektrophorese und Auswertung.....	42
3.7.3.10.	Latenznachweis von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> in der Pflanze.....	42
3.7.4.	<i>Schnelltest für Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> .....	43
3.7.4.1.	Abpinseln auf dem Feld.....	43
3.7.4.2.	Lagerung von Sporangienmaterial .....	43
3.7.4.3.	Extraktionsvereinfachung .....	43
3.7.4.4.	Lagerung der extrahierten DNA.....	43
3.7.5.	<i>Untersuchung der vorliegenden Isolate</i> .....	44
3.8.	STATISTIK .....	44
4.	ERGEBNISSE.....	45
4.1.	DATENERHEBUNG WACHSTUM SPINAT.....	45
4.2.	PATHOGENESE .....	49
4.2.1.	<i>Entwickeltes Boniturschema für Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> .....	49
4.2.2.	<i>Einfluß von Inokulumkonzentration und Zeit auf die Befallsstärke</i> .....	52
4.2.3.	<i>Pathogenese unter kontrollierten Bedingungen</i> .....	53
4.2.3.1.	Infektion .....	53
4.2.3.1.1.	Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur.....	53
4.2.3.1.2.	Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer.....	54
4.2.3.1.3.	Infektion in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer .....	56
4.2.3.2.	Dauer der Latenz.....	58
4.2.3.2.1.	Inkubations- und Latenzperiode in Abhängigkeit von der Temperatur.....	58
4.2.3.2.2.	Latenzperiode in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.....	60
4.2.3.3.	Sporulationsdauer und -intensität .....	62
4.2.3.3.1.	Sporulationsdauer und -intensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit.....	62
4.2.3.3.2.	Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Strahlung .....	64
4.2.3.3.3.	Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur .....	64
4.2.3.4.	Vitalität der Sporangien.....	65
4.2.3.4.1.	Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von der Temperatur.....	65
4.2.3.4.2.	Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von der Strahlung.....	67
4.2.4.	<i>Pathogenese unter Freilandbedingungen</i> .....	70
4.2.4.1.	Freilandversuchsbonituren .....	70
4.2.4.1.1.	Befallsverläufe.....	70
4.2.4.1.2.	Einflußfaktoren auf die Befallverläufe .....	71
4.2.4.1.3.	Räumliche Ausbreitung.....	75
4.3.	WIRT/PATHOGEN-INTERAKTION.....	78
4.3.1.	<i>Befall in Abhängigkeit vom Alter und Entwicklungsstadium</i> .....	78
4.3.2.	<i>Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese</i> .....	80

4.3.2.1.	Wachstumsparameter.....	80
4.3.2.2.	Messungen zum Einfluß auf die Photosynthese.....	84
4.4.	RASSENBESTIMMUNG.....	87
4.4.1.	<i>Infektionsversuche</i> .....	87
4.4.2.	<i>RAPD-PCR</i> .....	89
4.4.2.1.	Anmerkungen zur Methodik .....	89
4.4.2.1.1.	Produktion von Sporangienmaterial .....	89
4.4.2.1.2.	Vorbereitung der DNA.....	90
4.4.2.1.3.	DNA Extraktion.....	91
4.4.2.1.4.	RNA-Verdau.....	94
4.4.2.1.5.	Optimale DNA-Konzentration für die PCR .....	95
4.4.2.1.6.	RAPD-PCR Bedingungen.....	95
4.4.2.1.7.	Vorgehensweisen bei der Identifizierung von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> im Feld .....	98
4.4.2.2.	Untersuchung der vorliegenden Isolate.....	101
5.	DISKUSSION .....	104
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	133
7.	SUMMARY .....	136

ANHANG

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AFLP</b>	amplified fragment length polymorphism	<b>l</b>	Liter
<b>Anz.</b>	Anzahl	<b>LAI</b>	Leaf area index; Blattflächenindex
<b>aqua dest.</b>	destilliertes Wasser	<b>LB</b>	Laubblattpaar
<b>bef. BF</b>	Befallene Blattfläche	<b>LUE</b>	Lichtnutzungseffizienz
<b>BH</b>	Befallshäufigkeit	<b>m</b>	Meter
<b>BK</b>	Befallskategorie	<b>m<sup>2</sup></b>	Quadratmeter
<b>bp</b>	base pairs; Basenpaare	<b>min</b>	Minute
<b>BS</b>	Beleuchtungsstärke	<b>m</b>	milli (10 <sup>-3</sup> )
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>N</b>	Stickstoff
<b>ca.</b>	circa	<b>n</b>	nano (10 <sup>-9</sup> )
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>Nr.</b>	Nummer
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>OFB</b>	Oberflächenbonitur
<b>d</b>	day; Tag	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>d.h.</b>	das heißt	<b>PDA</b>	potato glucose agar; Kartoffel-Glukose-Agar
<b>dpi</b>	Tage nach-Inokulation	<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure	<b>Pfl.</b>	Pflanze
<b>dNTP</b>	2`- Desoxynukleotid-5`-triphosphat	<b>PPFD</b>	Photosynthetische Photonenflußdichte
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraethylenessigsäure	<b>RAPD</b>	Random amplified polymorphic DNA
<b>ET AL.</b>	et alii	<b>rel.</b>	relative
<b>f. sp.</b>	forma specialis	<b>rF</b>	Relative Feuchte
<b>Fa.</b>	Firma	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>FJ</b>	Frühjahr	<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>FM</b>	Frischmasse	<b>s</b>	Sekunde
<b>g</b>	Gramm	<b>s.</b>	siehe
<b>GD</b>	Grenzdifferenz	<b>S</b>	Sommer
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls	<b>Schtzg</b>	Schätzung
<b>GK</b>	Glaskügelchen	<b>SH</b>	Sporulationshäufigkeit
<b>h</b>	hour; Stunde	<b>spp.</b>	species
<b>H</b>	Herbst	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>hPa</b>	Hektopascal	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>IGZ</b>	Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.	<b>TM</b>	Trockenmasse
<b>INO</b>	Inokulum	<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>ITS</b>	internal transcribed spacer; interne transkribierte Spacer	<b>U</b>	Unit
<b>kg</b>	Kilogramm	<b>VK</b>	Vorkeimen
<b>KR</b>	Keimrate	<b>W</b>	Watt
<b>klx</b>	Kilolux	<b>z. B.</b>	Zum Beispiel
<b>L.</b>	Linne	<b>%</b>	Prozent
		<b>µ</b>	Mikro (10 <sup>-6</sup> )

## 1. Einleitung

Spinat (*Spinacia oleracea* L.) stammt ursprünglich aus dem heutigen Iran, wo die Pflanze schon vor rund 2000 Jahren angebaut wurde (PEIRCE 1987). Der heutige Name Spinat ist vom persischen Wort „ispanai“ abgeleitet, was soviel wie „grüne Hand“ bedeutet. Hieraus wurde im Spätlateinischen „spanachia“, was sich dann zu „spinach“ im Englischen und zum deutschen „Spinat“ entwickelte. Etwa 647 v. Chr. wurde Spinat in China eingeführt und gelangte von dort um 1100 nach Spanien ([http:// uga.edu](http://uga.edu)). Seit dem Mittelalter ist Spinat auch in Deutschland bekannt (PEIRCE 1987).

Spinat erfreut sich heute in Deutschland einiger Beliebtheit, so wurden im Jahr 2001/02 in Deutschland 76.800t Spinat verbraucht, das entspricht einem pro Kopf Verbrauch der Bevölkerung von 0,9 kg (BEHR 2002). Heutzutage befinden sich die größten Anbauflächen Europas in Italien, Frankreich und in Deutschland (RAMPOLD 2000). 2001 betrug die Anbaufläche für Spinat in Deutschland etwa 3.818 ha auf denen ca. 54.331,309 t Spinat produziert wurden (FAO 2002). Nordrhein-Westfalen (mit 1860 ha), Rheinland-Pfalz (mit 430 ha) (RAMPOLD 2000) und Sachsen (ca. 380 ha) zählen dabei zu den Hauptanbaugebieten (HARBRECHT, LATTASCHKE 1999). In den Bundesländern Brandenburg und Sachsen-Anhalt hat die Anbaufläche inzwischen stark zugenommen. Da Spinat häufig als tiefgekühltes Gemüse vom Verbraucher verwendet wird (im Jahre 2001: ein Verbrauch an Tiefkühlspinat von 18.551 t (BEHR 2002)), befindet sich der Vertragsanbau in Deutschland verstärkt in der Nähe der Tiefkühlkonservenfabriken (MATTUSCH UND MEYER 1997). Damit die Verarbeitungsindustrie kontinuierlich mit Spinat versorgt werden kann, soll die Anbauperiode im Jahr möglichst lang sein. Um dieses zu ermöglichen, wird Überwinterungsanbau betrieben, so daß schon zeitig im Frühjahr mit der Spinaternte begonnen werden kann.

Besonders im Frühjahr und im Herbst kann der Anbau von Spinat jedoch durch das Auftreten des pilzlichen Pathogens *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* Byford (Falscher Mehltau) stark beeinträchtigt werden. Die Befallssymptome äußern sich unter anderem durch eine Gelbfärbung der Blätter (CORRELL ET AL. 1994). Dieses führt im Frischmarkt- und besonders im Verarbeitungsbereich zu erheblichen Qualitätseinbußen und Ertragsausfällen. Zulässig ist für die Verarbeitungsindustrie ein maximaler Gelbanteil im Erntegut von 6%, wobei die Grenzwerte je nach gewünschtem Spinatprodukt variieren. Es ist daher von besonderem Interesse, Falschen Mehltau an Spinat zu bekämpfen.

So werden zur Befallsvermeidung zum einen resistente Spinatsorten angebaut (MATTUSCH, MEYER 1997). Jedoch werden diese Resistenzen immer wieder und in immer kürzeren Abständen durchbrochen, da das Pathogen neue Rassen ausbildet (ANON 1999). Aussagen zur

Rassenverteilung innerhalb Deutschlands, die für ein gezieltes Resistenzmanagement bedeutsam wären, sind bis zu dem aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt.

Zum anderen kann beim Anbau von Spinat zur Befallsbekämpfung auch der Einsatz eines Prognosemodells hilfreich sein. In der Phytopathologie verfolgen solche Entscheidungshilfen folgende Ziele: die Einsparung von Pflanzenschutzmitteln, die Reduktion von Kontrollaufwand für Felderhebungen, die Möglichkeit der Risikoabschätzung beim Unterlassen einer Pflanzenschutzmittelanwendung, die Anwendung biologischer Pflanzenschutzmittel sowie kalkulierte Kostenvorteile bei optimalem Einsatz der Entscheidungshilfen (KLEINHENZ UND JÖRG 1998). Aussagen zu Ertragsverlusten und eine genaue Terminierung von möglichen Pflanzenschutzmaßnahmen können somit die Wirtschaftlichkeit einer Kultur, wie der des Spinats, erheblich steigern. Ohne eine ausreichende Datenbasis läßt sich jedoch kein realistisches Modell entwickeln (HAU 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit gilt es, eine ausführliche Datenbasis für das Wirt-/Pathogensystem Spinat/Falscher Mehltau zusammenzustellen und zu erarbeiten. Die gewonnenen Daten sollen schließlich in das Submodell Epidemiologie des Prognosemodells einfließen (s. Abbildung 1).

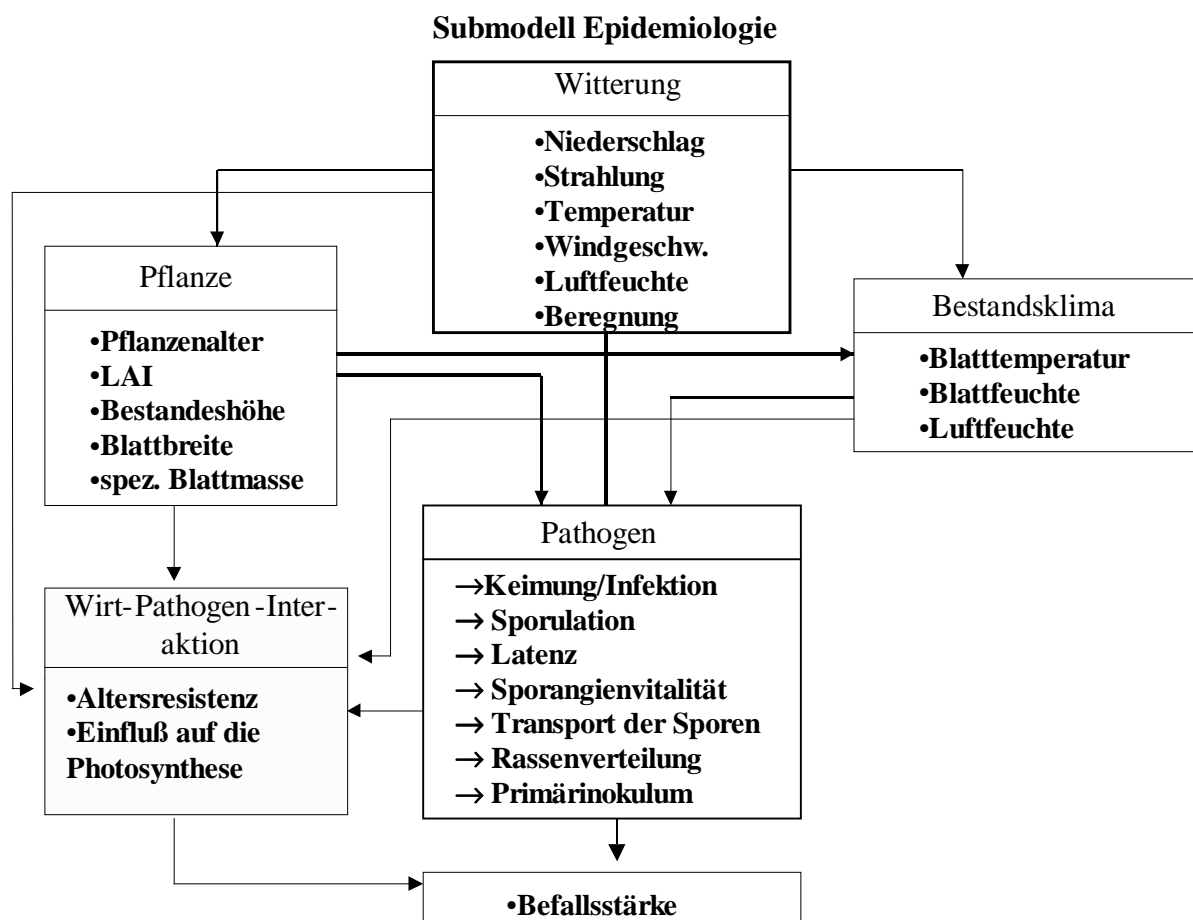


Abbildung 1: Schema des Submodells Epidemiologie



Dabei können als Grundeinflußfaktoren auf das Pathogen nicht allein die Witterungsparameter gelten, sondern es müssen ebenso die Daten zur Wirtspflanze und zum Bestandsklima einbezogen werden. „Eine realistische Simulation von Epidemien von Pflanzenkrankheiten ist also nur möglich, wenn auch die Wirtspflanze selbst auf Einflüsse der Umwelt reagieren kann“ (HAU 1995). Außerdem ist der Einfluß des Bestandsklimas bei den Erregern des Falschen Mehltaus besonders wichtig, da die Pathogenentwicklung besonders stark von Temperatur und Feuchte abhängt. Als Ausgabewert soll eine Angabe zur Befallsstärke gemacht werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt demnach auf der Datengewinnung zum Pathogen *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. In ihrem Rahmen werden bis zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehende Fragen zur Biologie des Erregers, zur Rassenverteilung, zur Wirt-Pathogen-Interaktion und zur Ausbreitung untersucht.

Somit lassen sich folgende Arbeitsziele definieren:

- **Datenerhebung Wachstum Spinat**
- **Untersuchungen zur Biologie des Erregers in Abhängigkeit von Witterungsfaktoren**
- **Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers unter Freilandbedingungen**
- **Untersuchungen zur Wirt – Pathogen - Interaktion**
- **Untersuchungen zur Rassenverteilung innerhalb Deutschlands**
- **Schaffung einer Datengrundlage für ein Prognosemodell**

## 2. Literaturüberblick

### *Spinacia oleracea* L: Einordnung und Bedeutung

Spinat (*Spinacia oleracea* L.) gehört zur Familie der Gänsefußgewächse, der Chenopodiaceae, und unterliegt folgender Systematik (ZANDER 2000):

Diviso:       Spermatophyta  
 Subdiviso:   Magnoliophytina  
 Classis:      Magnoliopsida  
 Subclassis:  Caryophyllidae  
 Ordo:         Caryophyllales  
 Familia:      Chenopodiaceae  
 Genus:        *Spinacia*  
 Species:      *Spinacia oleracea*

Verwendung finden ausschließlich die Blätter der Spinatpflanze, die sowohl gekocht als auch roh verzehrt werden (PEIRCE 1987). Spinat ist ernährungsphysiologisch von Bedeutung, da er reich an Mineralien und Vitaminen ist (KRUG 1991). Besonders hoch ist der Anteil an Vitamin A, B und C, Calcium, Kalium, Phosphor, Eisen, Zink, Kupfer, Natrium und Folsäure (KRUG 1991; <http://uga.edu>, SINGH ET AL. 2001). Insgesamt ist er somit förderlich für das Wachstum und die Blut- und Knochenbildung. Außerdem leistet Spinat seinen Beitrag zur Reduzierung des Krebsrisikos beim Menschen, denn es wurden neuerdings in den Spinatblättern zwei starke Antitumorpromotoren nachgewiesen (WANG ET AL. 2002).

Als problematisch kann der hohe Gehalt an Nitrat und Oxalsäure im Ernteprodukt gewertet werden (<http://www.lebensmittellexikon.de>). Für den Nitratgehalt liegen seit 1997 von der Europäischen Union Richtlinien für Höchstmengen vor (Verordnung (EG) Nr. 194/97): zugelassen sind derzeit maximal 2000 mg/kg bei verarbeitetem Spinat, 3000mg/kg bei frischem Spinat (Winter) und 2500 mg/kg bei frischem Spinat (Sommer).

Während der vegetativen Wachstumsphase bildet der Spinat eine kompakte Blattrosette aus (KRUG 1991). Der Übergang zur generativen Wachstumsphase zeichnet sich durch rasche Stengelverlängerung, dem sogenannten Schossen, und der Blütenbildung aus. Spinat ist eine Langtagpflanze, gesteuert wird die generative Entwicklung somit durch eine photoperiodische Reaktion, aber auch durch die Temperatur (KRUG 1991). Die auf dem Markt erhältlichen Spinatsorten weisen unterschiedlich starke photoperiodisch-thermische Empfindlichkeiten auf, so daß ein Spinatanbau fast das ganze Jahr über möglich ist.

Gedeihen kann Spinat auf einer Reihe von unterschiedlichen Böden; von Vorteil sind jedoch gehaltvolle Böden mit hohem Humusanteil. Da die Pflanzen sehr empfindlich auf den Boden-

pH- Wert reagieren, sollte ein Wert von 6,2 bis 6,9 eingehalten werden (<http://uga.edu>). Außer der Gewährleistung von ausreichend Feuchtigkeit, ggf. durch Zusatzbewässerung (KRUG 1991), ist also die Düngung des Bestandes von großer Bedeutung. Hier gilt es besonders die Stickstoffdüngung gezielt zu steuern, denn diese nimmt Einfluß auf den Nitratgehalt. Praxisüblich ist ein Düngungsrichtwert von ca. 200 kg N/ha, wobei eine Düngung auf zwei Düngungsgaben verteilt wird (SCHRÄDER 2000, mündliche Mitteilung).

Die Spinaternte erfolgt 37 bis 70 Tage nach der Aussaat (PEIRCE 1987). Da der Spinatanbau hauptsächlich für die Verarbeitungsindustrie erfolgt, wird zumeist maschinell mit Mähreschern geerntet. Je nach gewünschtem Endprodukt (z. B. Rahmspinat oder Blattspinat) kann der Stengelanteil durch die Mähhöhe variiert werden. Gleichzeitig kann auf diese Weise der Nitratgehalt des Produktes gesteuert werden, da in den Stielen des Spinates die höchsten Nitratgehalte zu finden sind (GREVSEN, KAACK 1996).

### ***Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*: Einordnung und Bedeutung**

*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ist ein obligat biotropher Parasit, der zur Klasse der Oomycetes gezählt wird. Die systematische Einteilung der höheren Pilze ist jedoch umstritten, es existieren mehrere taxonomische Aufteilungen (FÖRSTER UND COFFEY 1990). Traditionell werden die Oomyceten zu den höheren Pilzen gezählt. So ordnet sich nach HOFFMANN ET AL. (1994) der Falsche Mehltau an Spinat folgendermaßen in die Systematik ein:

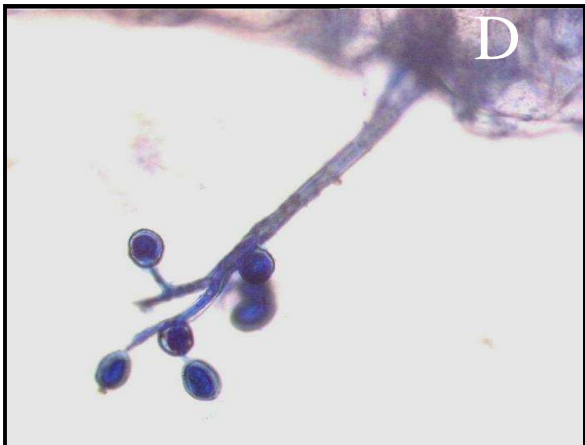
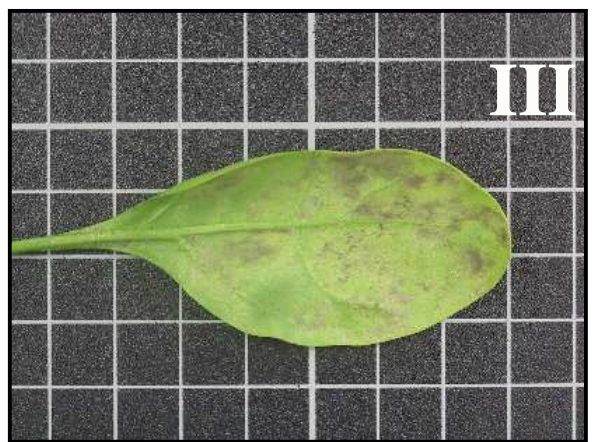
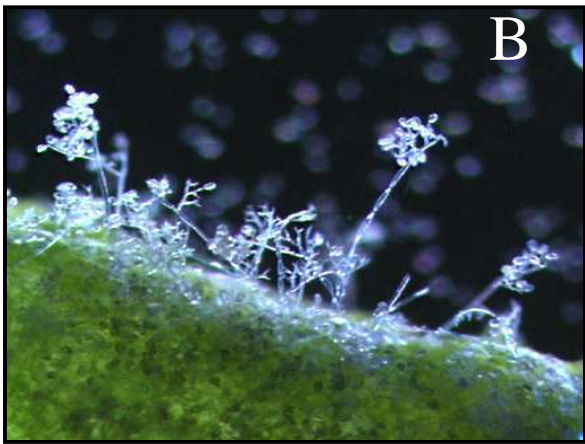
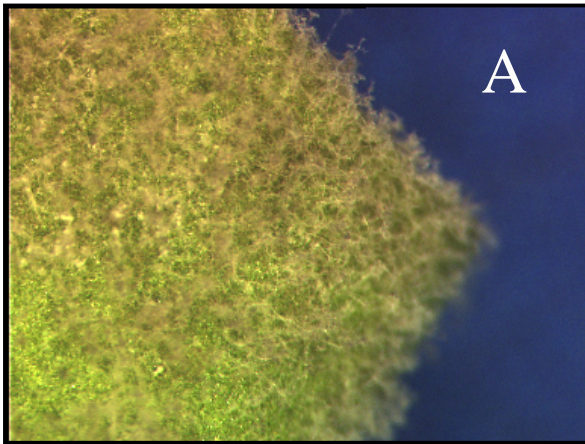
Abteilung:	Eumycota
Unterabteilung:	Mastigomycotina
Klasse:	Oomycetes
Ordnung:	Peronosporales
Familie:	Peronosporaceae
Gattung:	<i>Peronospora</i>
Art:	<i>Peronospora farinosa</i>

Nach neueren Erkenntnissen werden die Oomyceten zur Abteilung Oomycota (Unterabteilung Peronosporomycetidae, Ordnung Peronosporales, Familie Peronosporaceae) im Reich der Stramenophila gezählt, da sie Verwandtschaft zu heterokonten Algen mit Chlorophyll a und c aufweisen (ALEXOPOULOS et al. 1996).

Die Gattung *Peronospora* ist die größte in der Ordnung Peronosporales. *Peronospora*-Arten treten weltweit auf. Besonders verbreitet sind sie jedoch in Regionen mit gemäßigttem Klima (CONSTANTINESCU 1991). 1959 faßten YERKES AND SHAW den Falschen Mehltau an Chenopodiaceae als *Peronospora farinosa* (Fr.) Fr. zusammen. Innerhalb einer Art eines

Pathogens können oftmals bestimmte Pathotypen ausgemacht werden, die spezifisch für eine Wirtspflanze sind, und die als *formae speciales* bezeichnet werden (CRUTE 1981). Dieses ist auch bei *Peronospora farinosa* der Fall. Kreuzinokulationsversuche mit Falschem Mehltau von verschiedenen *Beta*-Arten, *Chenopodium album* und *Spinacia oleracea* ergaben eine Wirtsspezifität der Isolate. Entsprechend erfolgte eine Unterteilung von *Peronospora farinosa* in 3 *formae speciales* (BYFORD 1967). Der Falsche Mehltau an Spinat wird somit als *Peronospora farinosa* (Fr.) Fr. f. sp. *spinaciae* Byford geführt (BYFORD 1967, CONSTANTINESCU 1991) und tritt nur an Spinat auf. Weiterhin konnte bei einer Untersuchung der durch sexuelle Reproduktion gebildeten Oosporen noch festgestellt werden, daß *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* zwei mating types aufweist und somit heterothallisch ist (INABA UND MORINAKA 1984, VAN ASCH UND FRINKING 1988).

Symptomatisch äußert sich ein Befall des Spinats durch Falschen Mehltau zunächst als gelbgrüne chlorotische Läsionen auf der Blattoberseite. Die befallenen Stellen haben keine scharfe Abgrenzung zum gesunden Gewebe und werden auch nicht von der Blattnervatur abgegrenzt (RICHARDS 1939). Die Größe der Läsionen nimmt mit der Zeit zu, die Gelbfärbung wird immer intensiver (CORRELL ET AL 1990), und auf der Blattunterseite bildet sich an diesen Stellen ein grau- violetter Sporangien- und Sporangienträgerrasen (CRÜGER ET AL. 2002). Unter trockenen Bedingungen können die Läsionen ausbleichen und verbräunen (CORRELL ET AL. 1990). Bei feuchten Bedingungen welken, verbräunen und faulen die Blätter schließlich (RICHARDS 1939). Die folgenden Abbildungen geben eine genauere Vorstellung der Symptomatik:



I: Blattoberseits werden gelbliche Aufhellungen sichtbar; diese breiten sich nach und nach auf dem Blatt aus und der Gelbton intensiviert.

II - III: Blattunterseits wird der bläulich-gräuliche Mehлтаubelag sichtbar.

A - B: Nahaufnahme des Mehлтаubelags

C: Nahaufnahme der Sporangienträger. Ein Abschleudern der Sporangien geschieht durch Spiralisieren und Entspiralisieren des Sporangienträgers bei Veränderungen der Luftfeuchte (D). (Stereomikroskop Stemi SV11, Fa. Zeiss)

D: Sporangienträger bilden sich aus den Stomata heraus. Die Sporangienträger von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* sind hirschgeweihförmig. An sogenannten Sterigmen bilden sich die Sporangien. (Binokulares Mikroskop Axiolab, Fa. Zeiss; Vergrößerung 20x; Anfärbung: Lactophenolblau)

E: Gekeimtes Sporangium mit Keimschlauch (Binokulares Mikroskop Axiolab, Fa. Zeiss; Vergrößerung 10x)

***Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*: Biologie und Epidemiologie**

## Asexueller Entwicklungszyklus

Innerhalb des asexuellen Entwicklungszyklus erfolgt eine Infektion mit Falschem Mehltau über dünnwandige, luftbürtige Sporangien (LUCAS UND SHERIFF 1988). Unter geeigneten Umweltbedingungen keimen diese Sporangien auf der Wirtspflanze aus und bilden einen Keimschlauch (SARGENT 1981). Vor dem Eindringen in eine Epidermiszelle verdickt sich der Keimschlauch zu einem sogenannten Appressorium (KRÖBER ET AL. 1979). Appressorien werden als Haftorgane des Erregers verstanden, gleichzeitig aber auch als Nährstoffspeicher für das Pathogen (HOFFMANN ET AL. 1994). Das Eindringen von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* erfolgt nach RICHARDS (1939) durch die Kutikula zwischen zwei antiklinen Zellwänden, wohingegen KRÖBER ET AL. (1979) sowie auch MATTUSCH UND MEYER (1997) feststellten, daß ein Eindringen ebenfalls durch die Stomata erfolgen kann; dabei erfolgt allerdings selten eine Appressorienbildung.

Die Aussagen zur Sporangienkeimung bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, die in der relevanten Literatur zu finden sind, unterscheiden sich erheblich. Laut CORELL ET AL. (1994) kann eine Keimung bei einer Temperatur von 2°C bis 25°C stattfinden, wobei das Optimum zwischen 9 und 12°C liegt. DAINELLO ET AL. (1984) setzen dieses Optimum dagegen bei 4°C an, BEDLAN (1987) und RICHARDS (1939) bei 9°C. FRINKING ET AL. (1981) diskutieren eine Temperaturkurve mit zwei Optima, einem weiten Optimum zwischen 5-15°C und einem engen Optimum bei 25°C. Ein solches zweifaches Optimum diskutieren auch SADRAVI ET AL (2000).

Als Voraussetzung für eine Infektion werden in der Literatur zwei Stunden Blattnässedauer angegeben (RICHARDS 1939). Nach dem Eindringen in die Wirtspflanze erfolgt interzelluläres Wachstum des Pilzes mittels Hyphen im Wirtsgewebe. Über diese Hyphen kommt es zur Bildung von sogenannten Haustorien in den Wirtszellen, die eine Funktion bei der Nährstoffaufnahme haben (SARGENT 1981). Die Entwicklung von Läsionen wird nach CORRELL (1994) durch Temperaturen von 15 bis 25°C gefördert. SATOU (1999) hingegen stellte fest, daß eine Temperatur von 15°C den stärksten Befall verursacht. Bei höheren und niedrigeren Temperaturen kommt es seinen Ergebnissen zufolge zu einem sehr viel geringeren Befall, der jedoch einer hohen Streuung unterliegt.

Unter geeigneten Umweltbedingungen beginnt dann die Sporulation des Erregers, bei der auf der Blattunterseite Sporangienträger aus den Stomata wachsen. An den Enden dieser Sporangienträger sitzen die Sporangien, die nun in einem weiteren Infektionszyklus verbreitet

werden können. Eine Verbreitung der Sporangien kann durch Regen und Wind ausgelöst werden (MCCARTNEY UND FITT 1998). Gleichzeitig unterliegen viele Falsche Mehltäue einem diurnalen Rhythmus, wobei Sporangien, aufgrund der höheren relativen Feuchte, verstärkt am Morgen ausgeschleudert werden. Mit abnehmender relativer Feuchte im Tagesverlauf geht auch die Menge der freigesetzten Sporangien zurück (POPULER 1981). Die Verbreitung der Sporangien führt zur Ausbreitung des Befalls mit Falschem Mehltau. Räumlich gesehen, kann es sich bei dieser Ausbreitung um wenige Zentimeter oder aber mehrere hundert Kilometer handeln, je nachdem, ob die Sporangien durch Regen oder durch Wind verbreitet wurden (MCCARTNEY UND FITT 1998).

Eine Untersuchung möglicher Einflußfaktoren auf die Inkubations- und Latenzphase liegt für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* nicht vor. Für andere Falsche Mehltäue werden allerdings Temperatur und relative Feuchte als Einflußfaktoren auf die Inkubations- und Latenzphase diskutiert. Üblich ist für viele Falsche Mehltäue auch, daß die Inkubationsphase ca. 1 Tag kürzer ist als die Latenzphase (POPULER 1981).

Die Sporulation von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* beginnt ca. 6 bis 12 Tage nach Infektion (CORRELL ET AL. 1994). Nach FRINKING UND LINDERS (1986) beträgt die kürzeste Latenzdauer dagegen 7 Tage, wenn die Umweltbedingungen optimal sind. Einige wenige Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die Latenzperiode liegen vor. So untersuchten FRINKING UND VAN DER STOEL (1987) die Latenzperiode sowohl bei 15°C als auch bei 10°C. Diese betrug 8 bzw. 10 Tage. Eine lange Latenzperiode von 20 bis 40 Tagen wird bei niedrigen Temperaturen von 0 bis 5 °C diskutiert (FRINKING ET AL. 1985). Auch die Rolle der relativen Feuchte wird in der Literatur angesprochen. So stellte RICHARDS (1939) bei einer relativen Feuchte von 70 bis 90 % und einer Temperatur von 15,5 bis 24°C fest, daß die kürzeste Latenzperiode 6 Tage betrug. Er schlußfolgerte, daß *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in einem weiten Temperaturbereich sporuliert, so lange die relative Feuchte, die das Blatt umgibt, über 85% liegt.

In der Literatur finden sich darüber hinaus einige generelle Angaben zur Vitalität der Sporangien. COOK (1936) UND RICHARDS (1939) stellten fest, daß Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* einen Tag nach ihrer Bildung besser keimen als noch am selben Tag. Bei 16-21°C und einer Feuchte von 50-85% blieben die Sporangien am Blatt neun Tage vital. Gleichzeitig wurde der Einfluß von Austrocknung auf die Sporangien untersucht. Abgelöste Sporangien wurden über einen Zeitraum von 5-90 Minuten bei 24°C getrocknet. Schon nach 5 Minuten kam es zu einer erheblichen Reduktion der Keimfähigkeit und somit auch der Vitalität. Ähnlich verhält es sich bei Einwirkung von Sonnenlicht. Hier wurden abgelöste Sporangien über einen Zeitraum von 5 bis zu 60 Minuten dem Sonnenlicht



ausgesetzt. Schon 5 bis 15 Minuten Sonneneinwirkung verringerten die Keimfähigkeit erheblich (RICHARDS 1939). Untersuchungen zur Haltbarkeit und Vitalität der Sporangien führten auch O'BRIEN UND WEBB (1958) durch. Sie stellten fest, daß bei einer Lagerung von 0 bis 6 Monaten bei  $-23^{\circ}\text{C}$  die Keimfähigkeit von 19 auf 3,4 % abnahm; innerhalb von 1 bis 20 Tagen ging die Keimfähigkeit von 29,4 auf 13,2 % zurück. Ähnliches untersuchte SHEEN (1974), der frische Sporangien bei  $-50^{\circ}\text{C}$  5 Monate lang lagerte, ohne daß die Keimfähigkeit dadurch reduziert wurde. KRÖBER (1970) untersuchte die Vitalität der Sporangien an einer Reihe unterschiedlicher *Peronospora*-Arten, unter anderem auch an *Peronospora farinosa*. Die Vitalität wurde unter fünf verschiedenen Bedingungen untersucht: trockene und leicht feuchte Bedingungen im Freiland, trockene und leicht feuchte Bedingungen bei  $5^{\circ}\text{C}$  (alle Sporangien wurden dabei in Erde aufbewahrt) und Freilandbedingungen (Sporangien hafteten am Blatt). Von allen untersuchten Arten hatten die Sporangien von *P. farinosa* die kürzeste Haltbarkeit. Die Sporangien überlebten am besten unter trockenen Bedingungen bei  $5^{\circ}\text{C}$  (maximale Lebensdauer 50 Tage). KRÖBER führte 1981 weitere Untersuchungen durch, indem er frisches und getrocknetes Blattmaterial, das Sporulation des Erregers aufwies, bei unterschiedlichen Bedingungen lagerte. Am längsten blieb die Keimfähigkeit bei getrocknetem Material erhalten, das bei  $2^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, nämlich 45 bis 90 Tage.

### Sexueller Entwicklungszyklus

Oosporen entstehen bei der Verschmelzung von Antheridium und Oogonium, den Gametangien (MICHELMORE ET AL. 1988). Die Oosporen stellen die Überdauerungsorgane des Erregers von einer Wachstumsperiode zur nächsten dar. Sie werden somit als Primärinokulumquelle für das folgende Jahr diskutiert. Zu den Oosporen von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* liegen einige wenige Informationen vor. Es wurden Oosporen an kommerziellem Saatgut von Spinat entdeckt, und daher wurde die Samenübertragbarkeit diskutiert (COOK 1933, INABA 1985). FRINKING ET AL. (1985) führten eine Untersuchung zur Bildung von Oosporen bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* an Keimblättern durch und untersuchten dabei den Einfluß von Umweltfaktoren. Sie konnten feststellen, daß der Erreger in jungem Blattgewebe eine höhere Anzahl an Oosporen produzierte als in älterem Gewebe. In Bezug auf die Oosporenbildung gab es keinen Unterschied zwischen unterschiedlichen Wirtspflanzensorten. Bei niedrigen Inokulumkonzentrationen konnten weniger Keimblätter mit Oosporen nachgewiesen werden. Schließlich kam es zu einer verstärkten Oosporenbildung, wenn die Pflanzen während der zweiten Hälfte der Latenzphase Stressbedingungen ausgesetzt wurden. Angaben zu Keimung und Infektion der Oosporen

liegen jedoch nicht vor. Generell wird eine Stimulierung der Keimung der Oosporen durch Licht, Temperatur- oder Feuchtewechsel diskutiert.

Untersucht wurde weiterhin die Beziehung zwischen Sporangien- und Oosporenproduktion in Spinatblättern, die mit Falschem Mehltau infiziert waren. Es wurde dabei deutlich, daß nur wenige Sporangien produziert wurden, wenn in den infizierten Blättern viele Oosporen gebildet wurden und umgekehrt (INABA UND MORINAKA 1985). Was die Haltbarkeit der Oosporen betrifft, so wird ohne Belege eine Haltbarkeit von zwei Jahren angegeben (SCHARNHÖLZ 2000).

### ***Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* und *Spinacia oleracea* L: Wirt-Pathogen-Interaktion**

#### Einfluß auf die Photosynthese

Stressfaktoren, wie z.B. Pflanzenkrankheiten, können die Photosyntheseleistung einer Pflanze beeinflussen. Meistens wurde eine Verminderung der Photosynthese festgestellt, jedoch treten auch örtlich oder zeitlich begrenzte Steigerungen auf. Als Ursachen werden eine verminderte Energieausbeute durch Zerstörung bzw. Hemmung von photosynthetisch aktivem Gewebe, eine veränderte CO<sub>2</sub>-Aufnahme durch veränderte Stomatareaktionen und die Wirkung von Enzymen bzw. Pathotoxinen, diskutiert (HOFFMANN ET AL. 1994).

Obligate Parasiten, wie die Falschen Mehltau-Pilze, verursachen nach Befall nicht sofort eine massive Zerstörung des Wirtsgewebes, so daß die Photosyntheseaktivität bei Befall länger aufrecht erhalten wird. Es kommt allerdings zu einer lokalen Inhibierung der Nettphotosynthese und einer Stimulierung der Respiration. Die Mechanismen, die diese Abnahme der Photosynthese bedingen, sind umstritten. Das Pathogen könnte den Aufnahmeweg für CO<sub>2</sub> in die Pflanze und die Diffusion zu den Chloroplasten verändern, oder es könnte zu biochemischen Veränderungen wie der Inhibierung der Lichtreaktion der Photosynthese kommen (SCHOLES UND ROLFE 1995). Bei einigen obligaten Parasiten kann es zu einer vorübergehenden Stimulierung der Nettphotosynthese von ca. 10% 8 bis 48 Stunden nach Inokulation kommen (AYRES 1979). Hier werden als Grund kompensatorische Effekte in gesunden Wirtszellen diskutiert (AYRES 1979, LUCAS 1998).

Es liegen nur wenige Untersuchungen zum Einfluß der Falschen Mehltäue auf die Photosynthese vor. GARG UND MANDAHAR (1976) untersuchten den Einfluß von Falschem Mehltau (*Sclerospora graminicola*) bei *Pennisetum glaucum* und stellten eine 42,1 prozentige Abnahme der Nettphotosynthese fest. SHTIENBERG (1992) führte Versuche mit Falschem

Mehltau an Gurken (*Pseudoperonospora cubensis*) durch. Er konnte dabei eine starke Abnahme der Photosyntheseleistung (ca. 40%) und eine leichte Abnahme der Transpiration erkennen. Ebenfalls eine reduzierte Photosyntheseleistung konnten ORLANDINI UND GIUNTOLI (1998) bei der Interaktion von Wein (*Vitis vinifera*) mit *Plasmopara viticola* ausmachen, die einherging mit einer Veränderung des Gaswechsels im gesunden Blattgewebe, welches die Befallsstelle umgibt.

### Pathogenität und Resistenz

Bei Wirt-Parasit-Interaktionen können Resistenzfaktoren zu unterschiedlicher Anfälligkeit der Wirtspflanze gegenüber dem Parasiten führen. Diese Resistenzfaktoren können schon indigen in der Pflanze vorhanden sein, wie dies z. B. durch strukturelle Resistenzfaktoren und präformierte Abwehrsubstanzen der Fall ist. Es gibt aber auch Resistenzmechanismen, die erst mit erfolgter Infektion durch einen Parasiten induziert werden. Über eine spezifische Genaktivierung kommt es dann zu einer Neusynthese und Anreicherung von Stoffen, die in der gesunden Pflanze nicht vorhanden sind (ELSTNER ET AL. 1996). Die Anfälligkeit einer Wirtspflanze kann sich mit zunehmendem Alter der Pflanze/Pflanzenteile und entsprechend den Umweltbedingungen verändern (POPULER 1981).

Pflanzen zeigen gegenüber Oomyceten verschiedene Typen einer genetischen Resistenz. Diese kann auf Sortenebene ausgemacht werden (rassen- oder sortenspezifische Resistenz) oder auf Arten- bzw. Gattungsebene (Nicht-Wirt-Resistenz). Weiterhin kann die Resistenz auch von quantitativer Art sein (KAMOUN ET AL. 1999). Hierfür wurde z. B. von ZINKERNAGEL (1985) bei *Bremia lactucae* der Begriff unvollständige Resistenz verwendet, diese äußert sich in einer verlängerten Inkubationszeit und nachfolgend schwacher Sporulation.

### Altersresistenz

Besonders bei den Falschen Mehltauen kann das Pflanzenalter eine wichtige Rolle bei der Stärke und Intensität einer Infektionsausprägung spielen (LUCAS ET AL. 1981). Die Eigenschaft der Altersresistenz wird für viele Wirt-Pathogen-Beziehungen beschrieben. Bei Falschen Mehltauen gilt dies unter anderem für Brassica- und Raphanusarten und *Peronospora parasitica*, (KLUCZEWSKI ET AL. 1980, DICKSON UND PETZOLDT 1993, DAHL-JENSEN 1996), Sojabohne und *Peronospora manshurica* (WYLLIE UND WILLIAMS 1965), Salat und *Bremia lactucae* (DICKINSON UND CRUTE 1974), Tabak und *Peronospora tabacina*

(REUVENI 1986). Auch für *Peronospora farinosa* wird eine Altersresistenz angenommen, so nahm die Anfälligkeit von Zuckerrüben gegenüber *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* mit zunehmendem Alter stark ab (MEY 1971).

Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* konnte COOK (1936) feststellen, daß die unteren älteren Spinatblätter viel anfälliger gegenüber dem Pathogen waren als die jüngeren an der Spitze der Pflanze. Weiterhin stellte er fest, daß bei älteren Pflanzen oder solchen, die Samen ansetzten, die älteren unteren Blätter befallen wurden. FRINKING AND LINDERS (1986) zeigen eine dreidimensionale Darstellung der Entwicklung eines Mehltaubefalls in einem Spinatbestand. Aus den daraus hervorgegangenen Grafiken läßt sich vermuten, daß die höheren und älteren Blätter einer Spinatpflanze weniger anfällig gegenüber Falschem Mehltau sind. Die Autoren weisen jedoch in diesem Zusammenhang auf die für Falschen Mehltau klimatisch günstigen Bedingungen in der Tiefe eines Spinatbestandes hin.

#### Rassenspezifische Resistenz

Rassenspezifische Resistenz (gene-for-gene resistance, vertikale Resistenz) beruht auf der Interaktion zwischen Produkten spezifischer Avirulenzgene des Pathogens und spezifischer Resistenzgene des Wirtes (MAUCH-MANI 2002). Eine Rasse ist eine weitere Spezialisierung des Erregers, wobei die Pathogenität sich auf spezifische Wirtsgenotypen beschränkt (VAN DER PLANK 1982). Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* sind gegenwärtig sieben Rassen des Erregers bekannt, die sich in immer kürzeren Abständen entwickelten. Die Rasse 1 des Falschen Mehltaus an Spinat war nach BRANDENBERGER ET AL. (1991) schon vor 1900 bekannt. 1958 wurde die Rasse 2 in den USA (ZINK UND SMITH 1958) und in den Niederlanden und Nord- West Europa entdeckt (SMITH ET AL. 1961). Rasse 3 wurde zunächst 1976 in den Niederlanden nachgewiesen (EENINCK 1976) und dann 1978 in den USA (JONES UND DAINELLO 1982). Rasse 4 wurde 1991 in Kalifornien, USA (CORRELL ET AL. 1990; BRANDENBERGER ET AL. 1991) und 1992 in Europa, Italien entdeckt (NALI 1993). Zwei weitere Rassen des Falschen Mehltaus wurde 1998 in den USA identifiziert und als Rasse 5 und 6 beschrieben (CORRELL ET AL. 1998). Um eine Verwirrung bezüglich der Definition der Mehltaurassen zu vermeiden, hat die NAK Tuinbouw, Niederlande im Jahr 1999 eine neue internationale Nomenklatur der Rassen herausgegeben. Die Rassen 1 bis 4 wurden als Pf 1 bis Pf 4 definiert. Die frühere Rasse 5 in den USA und Rasse 6 in Europa werden jetzt als Pf 5 bezeichnet. Pf 6 findet man zur Zeit ausschließlich in Amerika und Rasse Pf7 findet man in Europa, hier ursprünglich bekannt als Rasse 5 (ANON. 1999). Untersuchungen haben ergeben, daß unter den einzelnen Rassen ein Konkurrenzverhalten zu vermuten ist. Pf 3 wird sowohl

von Pf 1 als auch von Pf 2 stark unterdrückt. Pf 1 dominiert zudem auch über Pf 2, allerdings ist hier die Konkurrenz wesentlich geringer als gegenüber Pf 3 (SCHUM 1982). Auch die quantitative Resistenz spielt bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* eine Rolle. So konnten CORRELL ET AL. (2000) ein weites Spektrum an partieller Resistenz bei 80 untersuchten Wirtsgenotypen entdecken.

Mit der Resistenzzüchtung gegen Falschen Mehltau begann man um 1946. In Pflanzenmaterial, das aus Iran stammte, wurden Resistenzen gefunden. Es konnte dabei bewiesen werden, daß diese Resistenz monogen dominant vererbt wird (SMITH 1950). Durch Einkreuzen in kommerzielle Spinatsorten erhielt man F1-Hybriden mit einer Resistenz gegenüber Falschem Mehltau (Pf 1) (JONES ET AL. 1956). Für 4 dominante Resistenzgene M1-M4 konnte später eine Kopplung und Homozygotie nachgewiesen werden (HANDKE 2000).

### Molekularbiologische Untersuchungen

Zur Identifizierung von Rassen phytopathogener Pilze werden zunehmend molekularbiologische Methoden eingesetzt. Die Charakterisierung beruht dabei auf einer Unterscheidung der DNA. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bietet eine einfache Methode zur exponentiellen Amplifizierung von DNA-Sequenzen (HENSON UND FRENCH 1993). Das DNA-Material kann aus einer Vielzahl von Quellen stammen (FOSTER ET AL. 1993). Die Methode wurde von Mullis entwickelt (MULLIS UND FALOONA 1987) und beruht auf drei Teilschritten: Die DNA wird dabei in einem ersten Schritt denaturiert. In einem zweiten Schritt lagern sich Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge an. Mit dem dritten Teilschritt erfolgt unter Einwirkung einer DNA-Polymerase und Vorhandensein der vier Desoxynukleotide, die am DNA-Aufbau beteiligt sind, die Ergänzung der Einzelstrangsequenzen zu doppelsträngigen Sequenzen. Diese können nun erneut den beschriebenen PCR-Zyklus durchlaufen. Auf diese Weise können die DNA-Sequenzen exponentiell vermehrt werden, denn meist werden bis zu 40 Zyklen durchlaufen. Eine  $10^5$ - bis  $10^6$ -fache Vermehrung, des durch verwendete Primer gekennzeichneten DNA-Abschnitts, ist möglich (ODENBACH 1997). Die einzelnen Schritte der PCR sind temperaturabhängig. So werden zur Denaturierung der DNA hohe Temperaturen um  $90^\circ\text{C}$  benötigt. Zum Primer-Annealing wird die Temperatur dann auf ca.  $50^\circ\text{C}$  gesenkt, und die anschließende Polymerisation zu einem Doppelstrang findet bei Temperaturen um  $70^\circ\text{C}$  statt (ODENBACH 1997).

Auf der Grundlage der PCR wurde die RAPD- (random amplified polymorphic DNA) Technik entwickelt. Hierbei werden molekulare Marker durch die Amplifikation von

zufälligen DNA-Segmenten mit Primern beliebiger Nukleotidsequenz generiert (WILLIAMS ET AL. 1993). RAPD-Untersuchungen sind bei einer Vielzahl von pflanzenpathogenen Pilzen bekannt. Zwischen *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum* ist damit eine Artenunterscheidung möglich (SCHILLING ET AL. 1994). Bei *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (ASSIGBETSE UND FERNANDEZ 1994), *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* (GRAYAL-MARTIN ET AL. 1993), *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (MANULIS ET AL. 1993), *Leptosphaeria maculans* (GOODWIN UND ANNIS 1991), *Uncinula necator* (DELYE ET AL. 1995), *Pseudocercoporella herpotrichoides* (NICHOLSON UND REZANOOR 1994), *Ascochyta rabiei* (FISCHER ET AL. 1995) und *Colletotrichum graminicola* (GUTHRIE ET AL. 1992) konnten Rassen oder Isolate unterschieden werden.

Bei den Oomyceten sind einige Untersuchungen mittels RAPD bekannt, so wurde die genetische Variation bei *Peronospora parasitica* vom THAM ET AL. (1994) und DAHL-JENSEN (1996) untersucht. Bei *Peronospora tabacina* konnte mittels RAPD eine 232 bp DNA-Sequenz ermittelt werden, die zum Nachweis dieses Pathogens verwendet werden kann (WIGLESWORTH ET AL. 1994). PARAN ET AL. (1991) und PARAN UND MICHELMORE (1993) nutzten RAPD zur Erstellung von PCR-basierten Markern, die in Bezug zur Resistenz gegenüber *Bremia lactucae* stehen. Eine Unterscheidung einzelner Rassen wurde bei *Peronospora valerianellae* von PIETREK UND ZINKERNAGEL (2002), bei *Plasmopara halstedii* von ROECKEL-DREVET ET AL. (1997) durchführt, ebenso wie eine Unterscheidung der Rassen von *Bremia lactucae* (GROTE 2000, mündliche Mitteilung).

## Modellarbeiten

Ein computergestütztes Simulationsmodell für Pflanzenpathogene wurde erstmals 1969 von WAGGONER UND HORSEFALL (zitiert in HINDORF 1997) für *Alternaria solani* an Tomate entwickelt. Seitdem kam es weltweit zur Entwicklung einer Vielzahl von Simulationsmodellen. Heute sind in Deutschland neben Simulationsmodellen für tierische Schaderreger wie BBA-Delia oder Bonn-Laas auch Modelle für pilzliche Pathogene wie SIMCERC (*Pseudocercospora herpotricoides*) (HINDORF 1997) oder Weizenmodell Bayern und Gerstenmodell Bayern (mehrere Mykosen) (<http://www.wzw.tum.de/pp/>) bekannt. Speziell bei der Bekämpfung von Oomyceten findet das PhythopthoraModell Weihenstephan (*Phytophthora infestans*) in der Praxis Verwendung (HAUSLADEN UND HABERMEYER 2000). Für die Falschen Mehлтаue liegen nur einige wenige Simulationsmodelle vor: ZWIPERO (*Peronospora destructor*), DOWNCAST (*Peronospora destructor*) (DE VISSER 1998), Hopfen-Peronospora-Warndienst (*Pseudoperonospora humuli*) (KREMHELLER

1983) und ein Prognosemodell für *Plasmopara viticola* an Wein (GHERARDI ET AL. 1999). In den USA sind außerdem noch Prognosemodelle für *Peronospora tabacina* an Tabak (*Nicotiana tabacum*) und *Pseudoperonospora cubensis* an Gurken (*Cucumis sativus*) bekannt (North American Plant Disease Forecast Center; <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/bluemold>; <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/cucurbit>). Schwierigkeiten entstehen bei der Umsetzung vieler Prognosemodelle in die Praxis, da ein hoher Validierungsaufwand notwendig ist. Daher wird versucht, mit Projekten wie PASO (Prognose agrarischer Schadorganismen) Prognoseverfahren zu testen, zu vereinheitlichen und in die Praxis einzuführen (GUTSCHE 1996).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Begriffsbestimmung

**Oberflächenbonitur (OFB):** Bonitur in Befallsklassen eines geschlossenen Spinatbestandes (je m<sup>2</sup>). Der Befall unter der Blattoberfläche im Bestand ist nicht sichtbar und wird nicht berücksichtigt.

**Befallshäufigkeit (BH):** Anzahl Pflanzen in der Versuchsparzelle, die mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* befallen sind.

**Befallsstärke (BS):** Anteil der Blattfläche (der Versuchspflanzen, in der Versuchsparzelle), der sichtbar (durch Blattaufhellungen und später Sporulation) vom Erreger befallen ist. Einheit ist die befallene Blattfläche (%).

**Befallsklasse (BK):** Gruppierung der Befallsstärke nach befallener Blattfläche (%). Folgende Klassen wurden festgelegt:

<b>Befallene Blattfläche (%)</b>	<b>Befallsklasse (BK)</b>
0	1
bis 0,1	2
bis 1	3
bis 3	4
bis 10	5
bis 30	6
bis 60	7
größer 60	8

**Inkubationsperiode:** Zeitraum von der Inokulation bis zum Sichtbarwerden erster Symptome (Blattaufhellungen) (VAN DER PLANK 1963).

**Latenzperiode:** Zeitraum von der Inokulation bis zur Sporulation des Erregers (VAN DER PLANK 1963).

**Sporulationsdauer:** Zeitraum, in dem der Erreger sporuliert.

**Sporulationshäufigkeit:** Anzahl Pflanzen einer Versuchsparzelle, die Sporulation des Erregers aufweisen.

**Sporulationsintensität:** Menge an Sporangien, die pro Läsion (definiert in Befallsklassen) produziert wird. Maßeinheit: Anzahl Sporangien pro Läsion, die in 1 ml aqua dest. abgepinselt werden.



Relative Sporulationsintensität: Sporulationsintensität pro 1% befallene Blattfläche; Umrechnung:  $x = \frac{\text{Wert der Sporulationsintensität der Befallsklasse}}{\text{Befallsklasse}}$ .

Strahlung: Maßeinheit ist die Beleuchtungsstärke. Es wurden bei den vorliegenden Untersuchungen 3 Beleuchtungsstärken gewählt:

Beleuchtungsstärke ( $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$ )	Stufe (BS)
280	1
380	2
610	3

Die drei verwendeten Beleuchtungsstärken entsprechen den Werten, die durchschnittlich in den Monaten Oktober (Herbst), März (Frühjahr) und Juli/August (Sommer) vorherrschen.

Entwicklungsstadium: Bewertung der phänologischen Entwicklungsstadien des Spinates anhand der BBCH Skala (FELLER ET AL. 1995) (s. A.2.). Bei der Erstellung dieser Arbeit wird ausschließlich auf das Makrostadium 1: Blattentwicklung eingegangen.

Entwickeltes Blattpaar: Die Spinatpflanze wurde zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten in entwickelte Blattpaare unterteilt. Dazu wurden immer zwei Laubblätter zusammengefaßt:

Laubblätter	Entwickeltes Laubblattpaar
Keimblätter 1 und 2	KB
Laubblätter 1 und 2	LB1
Laubblätter 3 und 4	LB2
Laubblätter 5 und 6	LB3
Laubblätter 7 und 8	LB4
Laubblätter 9 und 10	LB5
Laubblätter 11 und 12	LB6
Laubblätter 13 und 14	LB7

Blattflächenindex (LAI):  $\text{m}^2$  Blätter pro  $\text{m}^2$  Grundfläche

### 3.2. Datenerhebung Wachstumsmodell Spinat

Die Datenerhebung für das Wachstumsmodell wurde, getrennt von den Infektionsversuchen in Großbeeren, am Standort Golzow, Oderbruch (Brandenburg) in den Jahren 2000 und 2001 durchgeführt.

Alle Untersuchungen wurden mit der Spinatsorte „Ballet“ (Royal Sluis) durchgeführt. Diese zeichnet sich besonders durch eine hohe Schoßfestigkeit (Schoßbeginn spät bis sehr spät) und durch die Resistenz gegenüber den Rassen Pf1 bis Pf4 aus (BESCHREIBENDE SORTENLISTE 1997).

Die Aussaaten für die Wachstumsdatenerhebung erfolgten monatlich. (Vorgehensweise s. 3.4.1) Die Berechnung des Bestandes erfolgte nach Tensiometermessungen (0-600 hPa, Stelzner Fachberatungsgesellschaft mbH, Nürnberg). Gegen Unkraut wurde das Herbizid Betosip (Wirkstoff: Phenmedipham; Aufwandmenge: NAK 1 und 2: 1,0 l/ha) eingesetzt und bei eventuellem Mehltaubefall wurde ein Versuchspräparat (Wirkstoff: Dimethomorph) 0,1%ig verwendet.

Folgende Messungen wurden kontinuierlich im Bestand durchgeführt:

- Blattnässe: im Bestand und kurz über dem Bestand (Oberflächenfeuchtesensoren SW 120D, Fa. S.W. und W.S. Burrage, Großbritannien);
- Relative Luftfeuchte (Aspirationspsychrometer Typ 1.1130.10000 mit PT-100 Glas Sensoren, Fa. Thies-Clima, Göttingen);
- Temperatur (Aspirationspsychrometer Typ 1.1130.10000 mit PT-100 Glas Sensoren, Fa. Thies-Clima, Göttingen);
- Bodentemperatur (in 5 cm Tiefe) (Mittelwertsensoren 2m PT100 in Vierdrahttechnik, Fa. SfM Geraberg);

Gleichzeitig konnten auch die Werte der Wetterstation Golzow abgerufen werden:

- Temperatur und relative Luftfeuchte in 2 m Höhe;
- Temperatur in 100 cm; 50 cm; 20 cm Höhe über dem Boden;
- Temperatur in 5 cm; 20 cm; 50 cm Tiefe im Boden;
- Niederschlagsmenge mit 0,2 mm Auflösung;
- Globalstrahlung in W/m<sup>2</sup>;
- Windgeschwindigkeit in m/s.

Eine Bonitur der Wachstumsparameter Entwicklungsstadium, Bestandshöhe, Blattfläche, Frischmasse und Trockenmasse erfolgte einmal wöchentlich.

Die Bestandshöhe wurde an vier mit Stäben markierten Stellen im Spinatbestand gemessen indem ein Zollstock senkrecht in den Bestand gesteckt wurde und mit dem Auge die Höhe des

Bestands angepeilt wurde. Das Entwicklungsstadium wurde nach der BBCH-Skala (FELLER ET AL. 1995, s. A.2.) bestimmt. Als Blatt bewertet wurden nur die Blätter, die in der Länge mehr als 1-2 cm aufwiesen.

Bei den zufällig entnommenen Pflanzenstichproben betrug der Probenumfang 4 x einen laufenden Meter Spinatpflanzen. Ermittelt wurden hierbei die Anzahl Pflanzen und die Frischmasse dieser Pflanzen. Anschließend wurde die Blattfläche mit einem Blattflächenmeßgerät ermittelt (LI-3100 Area Meter, Fa. LI-COR, Lincoln, USA). Das Probenmaterial wurde anschließend im Trockenschrank bei 60°C ca. 7 Tage lang getrocknet, und die Trockenmasse bestimmt.

### **3.3. Pathogenese unter kontrollierten Bedingungen**

#### **3.3.1. Pflanzenanzucht**

Für die Vermehrung des Pathogens und die Infektionsversuche wurde, soweit nicht anders erwähnt, ausschließlich mit der Spinatsorte „Ballet“ (Royal Sluis) gearbeitet. Für die durchgeführten Versuche unter kontrollierten Bedingungen und die Vermehrung des Pathogens wurden, soweit nicht anders angegeben (s. 3.3.3), 8 Reihen der Spinatsorte „Ballet“ in Arbeitskisten (50x 32x 6 cm; Fa. Meyer, Rellingen) ausgesät. Die Kisten waren mit Fruhsdorfererde Typ P gefüllt. Pro Kiste ergab das ca. 70-80 Pflanzen. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 15/10°C Tag/Nachttemperatur aufgestellt. Eine Düngung der Pflanzen war von besonderer Bedeutung: Im Stadium BBCH 102 wurden die Spinatpflanzen in den Aussaatschalen mit 10-15 g Kalkammonsalpeter pro Schale gedüngt. Über die Wintermonate, d.h. Ende Oktober bis Mitte März, wurde im Gewächshaus eine Zusatzbelichtung eingeschaltet (Lampentyp: SON T 600 W 1 P23 (Fa. Philips, Hamburg)), die von 6-22 Uhr programmiert war. Wurde eine Beleuchtungsstärke von 500 klx unterschritten, so wurden die Lampen eingeschaltet.

#### **3.3.2. Erregerkultur**

Da *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ein obligates Pathogen ist, kann der Erreger nur auf lebendem Pflanzenmaterial vermehrt werden. Dazu wurden mit einem feinen Pinsel Befallsstellen, die Sporulation des Erregers aufzeigten, mit destilliertem Wasser abgepinselt. Die Konzentration dieser Sporensuspension wurde unter dem Mikroskop (Axiolab, Fa. Zeiss) mit Hilfe einer Thomakammer (Merck Eurolab GmbH, Berlin) überprüft. Die Sporensuspension wurde anschließend auf eine Konzentration von ca.  $5-7 \times 10^4$  eingestellt. Die Suspension konnte nun mit einem Reagenzglaszerstäuber (Merck Eurolab GmbH, Berlin) auf die Spinatpflanzen aufgetragen werden. Dabei sollten die Pflanzen gut benetzt werden, es

sollten sich jedoch keine Wassertropfen bilden, die vom Blatt ablaufen könnten. Im allgemeinen wurden die Pflanzen im Stadium BBCH 102 bis BBCH 103 inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Pflanzen für 24 Stunden dunkel und, zur Sicherung einer möglichst hohen relativen Feuchte (ca. 98%), unter befeuchteten Plastikhauben aufgestellt. Die im Gewächshaus eingestellte Temperatur für die Vermehrung des Erregers betrug 15/10°C Tag/Nachttemperatur.

Nach Ablauf der Latenzphase (bei der Vermehrung des Erregers betrug diese ca. 7 Tage) wurden die Pflanzen wieder für 24 Stunden dunkel und bei erhöhter relativer Feuchte (ca. 98%) unter befeuchteten Plastikhauben aufgestellt, um die Sporulation zu fördern.

### **3.3.3. Versuchsbedingungen der Infektionsversuche**

Die Untersuchungen zur Biologie des Erregers wurden in Klimaschränken Typ Bioline VB 1040 (Firma Voetsch, Balingen) durchgeführt. Temperatur, relative Feuchte und Beleuchtungsstärke konnten im Computer programmiert werden.

Um den Anforderungen der Falschen Mehltäue an eine hohe Feuchtigkeit bei Infektion und Sporulation zu entsprechen, waren die Schränke mit einer zusätzlichen Befeuchtungsanlage ausgestattet, die über einen Oberflächefeuchtesensor (Fa. S. W. & W. S. Burrage, Großbritannien) gesteuert wurde. Dabei konnten Impulszeiten und Dauer des Besprühens den Versuchsbedingungen entsprechend eingestellt werden.

#### **3.3.3.1. Einfluß von Inokulumkonzentration auf die Befallsstärke und die Latenz**

Untersucht wurde der Einfluß der Inokulumkonzentrationen  $10^3$ ;  $10^4$ ;  $5 \times 10^4$ ;  $10^5$ ;  $3 \times 10^5$  Sporangien/ml auf den Befall mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. Durchgeführt wurde der Versuch im Klimaschrank bei einer Temperaturführung von 15/10°C (16/8 Stunden) und einer Lichteinstellung von 40% (ca.  $380 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Die Pflanzenanzucht erfolgte wie unter Punkt 3.3.1 erwähnt. Eine Inokulation wurde zum Entwicklungsstadium BBCH 102-103 durchgeführt, wobei die Vorgehensweise im Abschnitt 3.3.2 bereits dargestellt wurde. Der Versuch wurde in 4-facher Wiederholung durchgeführt, wobei jeweils eine Reihe Spinatpflanzen pro Aussaatschale mit einer anderen Inokulumsuspension inokuliert wurde. Die Kontrollreihen wurden derselben Behandlung unterzogen, allerdings wurde mit dest. Wasser inokuliert. Nach 8 Tagen erfolgte die Ermittlung der befallenen Blattfläche (%) mit Hilfe der Bildanalyse. Die Bedingungen bei dem Versuch zum Einfluß der Inokulumkonzentration auf die Latenz werden in Abschnitt 3.3.3.3.1 dargestellt.

### 3.3.3.2. *Infektion*

#### 3.3.3.2.1. Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur

Es wurden die Temperaturstufen 3, 5, 8, 12, 15 und 28 °C untersucht. Dazu wurde eine Inokulumsuspension der Konzentration  $5-10 \times 10^4$  hergestellt. In 4-facher Wiederholung wurden PDA-Platten mit der Inokulumsuspension besprüht. Diese wurden anschließend bei den jeweiligen Temperaturen für 24 oder 48 Stunden dunkel aufgestellt. Die relative Feuchte während dieser Periode betrug >95%. Eine Auswertung erfolgte jeweils nach 24 oder 48 Stunden, indem die Keimrate der Sporangien gemessen wurde. Dabei wurden pro Petrischale je  $4 \times 100$  Sporangien ausgezählt. Als gekeimt wurden solche Sporangien gewertet, bei denen der Keimschlauch schon deutlich ausgeprägt war.

#### 3.3.3.2.2. Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer

Bei dieser Untersuchung wurde wie unter 3.3.3.2.1 beschrieben vorgegangen. Allerdings wurden Temperaturstufen von 5, 10, 15, 20, 25, und 30°C und Blattnässeperioden von 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden eingestellt. Nach 24 Stunden Dunkelheit erfolgte die Auswertung durch Auszählung der Keimrate der Sporangien (jeweils  $4 \times 100$  Sporangien).

#### 3.3.3.2.3. Infektion in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer

Die Versuchsparameter entsprechen den unter Punkt 3.3.3.2.2 genannten Einstellungen. Zur Ermittlung der Infektion wurden Spinatpflanzen inokuliert. Diese wurden 24 Stunden lang im Dunkeln den jeweiligen Untersuchungsbedingungen ausgesetzt. Hiernach wurden die Pflanzen im Gewächshaus bei einer Temperatureinstellung 15/10°C (16/8 Stunden) aufgestellt. Der Versuch wurde zweimal komplett wiederholt, pro Variante lagen dabei 4 Pflanzen vor. Nach 12 Tagen erfolgte eine Bonitur der Befallsstärke mit Hilfe der bildanalytischen Auswertung.

### 3.3.3.3. *Dauer der Latenz*

#### 3.3.3.3.1. Inkubations- und Latenzperiode in Abhängigkeit von der Temperatur und der Inokulumkonzentration

Eine Anzucht der Versuchspflanzen erfolgte wie unter 3.3.1, die Erregerkultur wie unter 3.3.2 beschrieben. Untersucht wurden die Temperaturvarianten 10/5, 15/10, 20/15 und 25/20 °C (jeweils Tag-/Nachttemperatur). Gleichzeitig wurde der Einfluß von drei Inokulumkonzentrationen:  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Sporangien/ml getestet. Nach Erreichen des Entwicklungsstadiums BBCH 102-103 wurden die Pflanzen bei der jeweiligen

Tagestemperatur inokuliert und 24 Stunden lang im Dunkeln bei hoher relativer Luftfeuchte (>95%) aufgestellt. Jeweils 2 Pflanzenreihen pro Schale wurden bei der Inokulation mit einer Glasplatte abgeschirmt und mit aqua dest. Inokuliert, sie stellten die Kontrollpflanzen dar. Hiernach wurde der Tag-/Nachtverlauf 16/8 Stunden mit einer Bestrahlungsstärke BS 2 am Tag eingestellt. Die Einstellung der relativen Feuchte betrug 85/95% Tag/Nacht. Der Versuch wurde mit 4 Wiederholungen durchgeführt, wobei eine Aussaatschale eine Wiederholung darstellte. Die inokulierten Pflanzen wurden täglich auf Mehltaubefall hin bonitiert. Bei beginnender Sporulation wurden die Pflanzen jeweils über Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von >95% aufgestellt. Befallshäufigkeit und Sporulationshäufigkeit wurden erfasst, nach Ablauf von 9 Tagen wurde bei allen Pflanzen die Befallsstärke mit Hilfe der Bildanalyse bestimmt.

#### 3.3.3.3.2. Latenzperiode in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke

Die Pflanzenanzucht für diese Untersuchung erfolgte analog 3.3.1. Im Entwicklungsstadium BBCH 102-103 wurden die Pflanzen mit einer Sporangiensuspension der Konzentration  $5-10 \times 10^4$  inokuliert. Jeweils 2 Pflanzenreihen pro Schale wurden bei der Inokulation mit einer Glasplatte abgeschirmt und mit dest. Wasser inokuliert, sie stellten die Kontrollpflanzen dar. Die Temperatur zur Inokulation betrug 10°C, die Pflanzen wurden für 24 Stunden im Dunkeln bei einer relativen Feuchte von >95% aufgestellt. Hiernach erfolgte eine Tag-/Nachteinstellung von 16/8 Stunden, 15/10°C und einer relativen Feuchte von 85/95%. Drei Beleuchtungsstufen wurden für den Versuch gewählt: BS1-3 (s. 3.1). Der Versuch wurde mit 4 Wiederholungen angelegt, wobei eine Aussaatschale eine Wiederholung darstellte. Die inokulierten Pflanzen wurden täglich auf Mehltaubefall hin bonitiert. Bei beginnender Sporulation wurden die Pflanzen jeweils über Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von >95% aufgestellt. Befallshäufigkeit und Sporulationshäufigkeit wurden erfasst und nach Ablauf von 10 Tagen wurde bei allen Pflanzen die Befallsstärke mit Hilfe der Bildanalyse bestimmt.

#### 3.3.3.4. *Sporulationsintensität*

##### 3.3.3.4.1. Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit

Die Pflanzenanzucht erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Zum Entwicklungsstadium BBCH 102-103 wurden die Pflanzen bei 10°C inokuliert und Infektionsbedingungen (>95% rF, 24h Dunkelheit) ausgesetzt. Danach erfolgte eine Tag-/Nachteinstellung von 16/8 Stunden bei 15/10°C, BS 2 und 85/95% rF. Der Versuch wurde mit 4 Wiederholungen durchgeführt: Nachdem Befall mit Falschem Mehltau sichtbar wurde, wurden jeweils 4 Befallsstellen in den Befallsklassen 4, 5 und 6 gekennzeichnet, indem nummeriertes Klebeband am Stiel des

jeweiligen befallenen Blattes befestigt wurde. Die Pflanzen wurden dann jeweils nach 5, 8 und 11 dpi über Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von >95% aufgestellt. Zur Bewertung der Sporulationsintensität wurden die Befallsstellen in 1 ml aqua dest. abgepinselt und anschließend die Konzentration der Sporensuspension mikroskopisch mit Hilfe der Thomakammer bestimmt (jeweils 4 Auszählungen pro Wiederholung). Bei der Untersuchung der Sporulationsintensität, bei der jeden Tag optimale Sporulationsbedingungen vorlagen, wurden die Pflanzen jede Nacht bei einer relativen Luftfeuchte von >95% aufgestellt. Eine Auswertung erfolgte somit täglich, bis keine Sporangien mehr festgestellt werden konnten.

#### 3.3.3.4.2. Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Strahlung

Die Versuchsdurchführung erfolgte zunächst wie in Abschnitt 3.3.3.4.1 beschrieben. Bei der auf die Infektionsphase folgenden Tag-/Nachteinstellung wurden für die Tageseinstellung drei Beleuchtungsstufen eingestellt: BS 1 bis 3. Nach 9 dpi wurde die Sporulationintensität bei jeweils 4 Befallsstellen der Befallsklassen BK 6 und BK 7 durch Abpinseln in ca. 1 ml aqua dest. gemessen. Die Bestimmung der Sporangienkonzentration erfolgte wiederum mikroskopisch mit Hilfe einer Thomakammer (jeweils 2 Auszählungen pro Wiederholung).

#### 3.3.3.4.3. Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Versuchsdurchführung erfolgte ebenfalls wie unter Punkt 3.3.3.4.1 beschrieben. Nach der 24stündigen Infektionsphase erfolgte eine Tag-/Nachteinstellung von 16/8 Stunden bei 15/10°C, BS 2 und 85/95% rF. Die Pflanzen wurden täglich auf Befall mit Falschem Mehltau bonitiert. Bei einsetzendem Befall wurden die Pflanzen jede Nacht bei jeweils 5,10,15 und 20°C unter Sporulationsbedingungen (relative Luftfeuchte von >95%; 8 Stunden dunkel) aufgestellt, und es wurde täglich die Sporulationsintensität ermittelt (s. 3.3.3.4.1). Dazu wurden in 4 facher Wiederholung Läsionen der BK6 in 1 ml aqua dest. abgepinselt. Die Bestimmung der Sporangienkonzentration erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Thomakammer (jeweils 4 Auszählungen pro Wiederholung). Die Sporulationsintensität wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen.

### 3.3.3.5. Vitalität der Sporangien

#### 3.3.3.5.1. Sporangienvitalität in Abhängigkeit von der Temperatur

Zunächst erfolgte die Anzucht der Pflanzen und die Erregerkultur wie unter 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben. Der Versuch wurde in Klimaschränken durchgeführt, wobei der Versuchsumfang pro Schrank 3 Aussaatschalen betrug. Die inokulierten Pflanzen wurden bis zur Symptombildung bei 15/10°C und einer 16/8 Stunden Tag/Nacht-Einstellung bei 85/95% rel. Feuchte aufgestellt. Zur Sporulation wurden die Pflanzen über Nacht bei 95% mit Zusatzbefeuchtung aufgestellt. Danach wurden die Pflanzen bei den zu untersuchenden Temperaturen von 5, 10, 15 und 20 °C aufgestellt (rel. Feuchte konstant 85%; 16/8 h Tag/Nacht). Gleichzeitig wurden Petrischalen mit abgelösten Sporangien vorbereitet: Befallsstellen, die Sporulation des Erregers aufwiesen, wurden leicht in Petrischalen abgeklopft, ggf. vorsichtig mit einer Rasierklinge abgelöst, ohne dabei das Blatt zu verletzen. Jede Petrischale erhielt Sporangien von 4 verschiedenen Befallsstellen des jeweiligen Schrankes. Diese Petrischalen wurden ebenfalls zusammen mit den Versuchspflanzen bei den zu untersuchenden Bedingungen aufgestellt.

Nach 0, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden erfolgte jeweils eine Probenahme für die am Blatt haftenden Sporangien sowie für die abgelösten Sporangien in den Petrischalen. Hierzu wurden bei den anhaftenden Sporangien jeweils 4 Befallsstellen in 10 ml aqua dest. abgepinselt. Die verwendeten Blätter wurden danach entfernt, um ein mehrmaliges Abpinseln zu verhindern. Bei den abgelösten Sporangien wurden jeweils pro Probenahme und Variante zwei Petrischalen mit 10 ml aqua dest. aufgeschwemmt. Beide Suspensionen wurden mit einem Reagenzglaszerstäuber auf jeweils 2 PDA-Platten aufgesprüht und bei 10°C in Dunkelheit für 24 h aufgestellt. Die Keimrate wurde ermittelt, indem 4x 100 Sporangien unter dem Mikroskop ausgezählt wurden und die Anzahl keimender Sporangien bestimmt wurde. Für die Auswertung erfolgte eine Gruppierung der ermittelten Keimratenwerte nach 1,3,5 und 7 Tagen.

#### 3.3.3.5.2. Sporangienvitalität in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke

Bei dieser Untersuchung wurde bei der Versuchsdurchführung ebenso vorgegangen wie bei der Untersuchung der Sporangienvitalität in Abhängigkeit von der Temperatur. Allerdings erfolgte die Inokulation bei 15°C, auch bei der Einstellung der Versuchsbedingungen wurde die Temperatur konstant bei 15°C gehalten. Die Tag-/Nacht-Einstellung betrug 16/8 h, wobei am Tag die Beleuchtungsstufen BS1, BS2 und BS3 eingestellt wurden. Eine Probenahme



erfolgte zusätzlich noch nach 192 und 216 Stunden, zur Auswertung wurde eine Gruppierung der Werte nach 1,3,5,7 und 9 Tage durchgeführt.

### **3.4. Pathogenese unter Freilandbedingungen**

#### **3.4.1. Pflanzenanzucht**

Die Untersuchungen zur Pathogenese im Freiland wurden auf den Freilandflächen des IGZ in Großbeeren durchgeführt. Der Untersuchungszeitraum umfaßte drei Vegetationsperioden (die Jahre 2000-2002) mit jeweils drei Sätzen Spinat. Im Anbaujahr 2002 wurde die Untersuchung auch in zwei Sätzen an der Versuchsstation des IGZ in Golzow/Oderbruch durchgeführt.

Die Größe des angelegten Spinatfeldes betrug dabei jeweils ca 30 x 80 m (in Golzow 20 x 40 m). Mit einer Einzelkornsähmaschine „Accord“ (80iger Scheibe; 40 Samen/m mit Schlupf, 2,5 cm Abstand in der Reihe) wurde Spinat der Sorte „Ballet“ (Royal Sluis) ausgesät, um die Vorgabe der Verarbeitungsindustrie von ca. 300 Pflanzen/m<sup>2</sup> einzuhalten.

In regelmäßigen Abständen wurden vor der Aussaat, vor der Kopfdüngung und nach der Ernte jeweils Bodenproben in 30 cm Tiefe entnommen. Bei der Düngerbedarfsermittlung wurden die Vorgaben der Verarbeitungsindustrie erfüllt: Sollwert zur Aussaat: 130kg N/ha; Sollwert zur Kopfdüngung (ca. BBCH 104): 160 kg N/ha. Die erste Gabe erfolgte als Kalksalpeter, die zweite Gabe als Kalkammonsalpeter. Die Steuerung der Zusatzbewässerung erfolgte über das PC-Programm BEREST. Gegen Unkrautbefall wurde das Herbizid Betosip (Wirkstoff: Phenmedipham; Aufwandmenge: NAK 1 und 2: 1,0 l/ha) eingesetzt.

#### **3.4.2. Versuchsdurchführung**

Das für die Versuche benötigte Inokulum wurde nach der unter 3.3.2 erläuterten Vorgehensweise im Gewächshaus produziert. In den angelegten Spinatfeldern wurde jeweils zum Stadium BBCH 103 (über 50 % der Pflanzen hatten dieses Entwicklungsstadium erreicht) eine definierte Menge an Inokulum (durchschnittlich 30-40 ml mit einer Konzentration  $11 \times 10^4$  Sporangien/ml) des Erregers zentral ausgebracht. Um ein Infizieren durch den Pilz sicherzustellen, wurde die Inokulation in einen an einer Wasserleitung angeschlossenen Beregnungsring gesetzt, der mit Sprühdüsen versehen war. Sobald die Spinatblätter abtrockneten, wurden die Blätter besprüht, um eine ausreichende Blattnässedauer zu garantieren, denn der Sprühmechanismus wurde von einem Oberflächenfeuchtesensor (SW 120D Fa. S. W. &W. S. Burrage, Großbritannien) gesteuert. Dieser Ring wurde für 24 Stunden nach der Infektion eingeschaltet.

Im Bestand wurden ab Aussaat folgende Klimaparameter erfaßt:

- Blattnässe: im Bestand und kurz über dem Bestand (Oberflächenfeuchtesensoren SW 120D, Fa. S.W. und W.S. Burrage, Großbritannien);
- Relative Luftfeuchte (Aspirationspsychrometer Typ 1.1130.10000 mit PT-100 Glas Sensoren, Fa. Thies-Clima, Göttingen);
- Temperatur (Aspirationspsychrometer Typ 1.1130.10000 mit PT-100 Glas Sensoren, Fa. Thies-Clima, Göttingen);
- Bodentemperatur (5 und 10 cm Tiefe) (PT - 100 - Keramiksensor mit Edelstahlhülle in Vierdrahttechnik, Firma SfM Geraberg);

Nach erfolgreicher Infektion erfolgte in wöchentlichen Abständen eine Bonitur über die Ausbreitung des Schaderregers nach dem entwickelten Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. Zu diesem Termin wurde zudem das Entwicklungsstadium des Bestands festgestellt. Am Abend vor jeder Bonitur erfolgte mittels Regenwagen eine Befeuchtung des Spinatbestandes (1mm Beregnung), um eine Sporulation zu induzieren. Dieses sollte im Falle einer Unsicherheit in der Identifizierung einer Blattläsion die eindeutige Identifizierung von *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* ermöglichen.

### **3.5. Bonitur des Befalls**

#### **3.5.1. Bonitur der Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen**

Bei der Bonitur von Infektionsversuchen zur Biologie des Erregers konnte die befallene Blattfläche mit Hilfe eines bildanalytischen PC- Programms (KS 400, Fa. Zeiss) ermittelt werden. Mit Hilfe bildanalytischer Methoden konnte eine Vielzahl an befallenen Spinatblättern gemessen werden. Die Messungen wurden so justiert, daß die Blattaufhellungen aufgrund des Pathogens genau erfaßt wurden. Somit konnte ein Bildanalyse-Makro für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* erstellt werden. Die befallene Blattfläche, die bei Infektionsversuchen erzielt wurde, konnte damit eindeutig bewertet werden. Gleichzeitig wurde die gesamte Blattfläche der untersuchten Pflanzen ermittelt, so daß eine Berechnung der befallenen Blattfläche in Prozent der gesamten Blattfläche möglich war. Eine visuelle Einschätzung des Befalls bei Infektionsversuchen unter kontrollierten Bedingungen erfolgte mit dem für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* erstellten Boniturschema (s. 4.2.1).

### 3.5.2. Bonitur der Freilandversuche

Für die Bonitur im Freiland wurde in zwei Schritten vorgegangen: zunächst erfolgte die Erstellung eines Boniturschemas (s. A.6.). Dazu wurde eine Vielzahl von befallenen Blättern mit Hilfe des Bildanalysemakros für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* bewertet. So konnten Beispielbilder für die einzelnen Boniturklassen erstellt werden. Die Boniturklassen wurden in folgende Stufen 0; 0- 0,1; 0,1-1; 1-3; 3-10; 10-30; 30-60; 60-100% eingeteilt. Mit Hilfe dieser Schablone konnte, solange sich die Spinatpflanzen noch in einem jungen Entwicklungsstadium (bis Entwicklungsstadium ca. BBCH 109- 110) befanden, eine genaue optische Bewertung des Befalls erfolgen. Bei dem zu bonitierenden Feld wurde jeder Quadratmeter getrennt bewertet, und es ließen sich leicht die Anzahl befallener Blätter einer Boniturklasse pro Quadratmeter ermitteln. Es konnten nun Rückschlüsse auf die tatsächlich befallene Blattfläche gemacht werden. Über die Wachstumsdatenerhebung für Spinat ist bekannt, welche Blattfläche zu welchem Entwicklungsstadium auf einem m<sup>2</sup> vorhanden ist. Über die definierte Anzahl an Pflanzen/m<sup>2</sup> (300) ließ sich ein durchschnittlicher Wert für die Blattfläche pro Blatt ermitteln. Eine Umrechnung der Boniturwerte in tatsächlich befallene Blattfläche konnte nun erfolgen.

Je näher der Erntetermin kommt und je dichter sich der Bestand geschlossen hat, desto schwieriger erweist sich eine Bonitur. Es erfolgt in diesem Fall nur eine Bewertung des Oberflächenbefalls (OFB). Dieses führt zu einer Unterschätzung des Befalls im Bestand. Eine Korrektur der befallenen Blattfläche muß demnach nach dem Bestandsschluß (ca. BBCH 110) erfolgen.

Um den Befall mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in tieferliegenden Blattschichten zu bewerten, wurden von einzelnen Quadratmetern zufällige Pflanzenstichproben (Umfang jeweils 20 Pflanzen pro Stichprobe; 11 Stichproben) ausgewählt und die Einzelpflanzen komplett auf ihren tatsächlichen Befall hin bonitiert. Von diesen Pflanzenstichproben wurde der Mittelwert der befallenen Blattfläche in Prozent pro Stichprobe ermittelt. Es wurde eine Korrelation zwischen dem OFB und dem Mittelwert der untersuchten Pflanzenstichproben untersucht. Bei allen weiteren Freilandbonituren wurden die Boniturwerte nach dem Bestandsschluß durch die ermittelte Beziehung korrigiert, um den tieferliegenden Befall zu berücksichtigen.

### 3.6. Wirt/Pathogen-Interaktion

#### 3.6.1. Anfälligkeit in Abhängigkeit von Alter und Wachstumsstadium der Wirtspflanzen

Im Abstand von einer Woche wurden jeweils 8 Spinatpflanzen in Einzeltöpfen (9x9x10 cm) im Gewächshaus angezogen. Zum Inokulationstermin lagen Pflanzen der folgenden Entwicklungsstadien und Alter vor:

**Tabelle 1: Entwicklungsstadium der Versuchspflanzen zur Inokulation**

Alter (Wochen)	Entwicklungsstadium (BBCH) zum Inokulationstermin
1 Woche	BBCH 100
2 Wochen	BBCH 102
3 Wochen	BBCH 105
4 Wochen	BBCH 107
5 Wochen	BBCH 108

Die Temperaturvarianten 10/5°C, 15/10°C und 20/15°C wurden in drei Klimaschränken eingestellt. Die Varianten entsprechen Temperaturen, die als Monatsmittel für die Monate April, Mai und August aus langjährigen Datenerhebungen errechnet wurden. Die Tag/Nachtdauer betrug 16/8 Stunden, die rel. Luftfeuchte 85/98%.

Die Pflanzen wurden gleichmäßig mit einer Inokulumsuspension der Konzentration  $5-8 \times 10^4$  inokuliert. Hiernach wurden sie in 3 Klimaschränken für 24 h bei der Nachttemperatur der Temperaturvarianten und 98 % rel. Feuchte dunkel aufgestellt. Nach 11 Tagen wurden die Pflanzen mit Hilfe des in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Boniturschemas bonitiert. Es wurden dabei alle Blätter, die zum Zeitpunkt der Bonitur vorhanden waren, bewertet also auch jene Blätter, die erst nach der Inokulation ausgewachsen waren. Blätter gingen nur in die Bewertung mit ein, wenn sie größer als 1-2 cm waren. Hier wurde jedes Blatt visuell mit dem im Anhang (s. A.6.) dargestellten Boniturschema für Falschen Mehltau in Relation zu seiner Blattfläche bonitiert.

### **3.6.2. Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese**

#### **3.6.2.1. Gaswechselkammer**

Die Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese wurden in einer am IGZ vorhandenen Gaswechselkammer durchgeführt. Die Gaswechselkammer besteht aus Plexiglas und hat eine Größe von 101 x 52 x 170 cm. Die für den Versuch angestrebte Bestrahlungsstärke von 500-600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  auf der Blattoberfläche der Pflanzen konnte durch vier Lampen des Typs SON T 600 W 1 P23 (Fa. Philips, Hamburg) erreicht werden.

Über eine Klimatisierung konnten Temperatur und Feuchte in der Kammer eingestellt werden. Die von den Pflanzen verbrauchte  $\text{CO}_2$ -Menge wird dem System über einem Massestromregler 5850E (Fa. Brooks Instrument Rosemount) in entsprechender Menge wieder zugeführt. Eine Frischluftzufuhr dient der Lufterneuerung, Absenkung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration und des Einstellens eines geringen Überdrucks. Sie erfolgt über einen Kompressor, wobei der Luftdurchsatz erfaßt wird (HEIBNER 1997).

#### **3.6.2.2. Versuchsdurchführung**

Die Anzucht von 40 Aussaatschalen Spinat (60x40x6 cm) für die Untersuchungen erfolgte im Gewächshaus unter den unter 3.3.1 beschriebenen Bedingungen. Eine Pflanzdichte von 300 Pfl./ $\text{m}^2$  wurde auf die Schalenfläche umgerechnet. Nach Erreichen des Entwicklungsstadiums BBCH 102 wurden 20 Aussaatschalen mit dem Isolat GB 1 (Rasse Pf7) infiziert (Konzentration der Sporensuspension  $5\text{-}7 \times 10^4$ ). Diese Schalen wurden in einer weiteren Gewächshauskabine, getrennt von den anderen 20 Schalen mit gesunden Spinatpflanzen, weiterkultiviert. Alle Pflanzen wurden täglich gegossen. Um zu überprüfen, ob in beiden Gewächshauskabinen die selben Wachstumsbedingungen vorherrschten, wurden in beiden Kabinen simultan folgende Klimamessungen durchgeführt:

- Messung der Lufttemperatur und -feuchte mittels Aspirationspsychrometer (Typ 1.1130.10.000 mit PT 100 -Glassensoren, Fa. Thies-Clima, Göttingen);
- Messung der Blattfeuchte mittels Blattnässesensoren (Oberflächenfeuchtesensoren SW 120D, Fa. S.W. und W.S. Burrage, Großbritannien);
- Messung der Bestrahlungsstärke (PPFD); Quantensensoren Li 190 SZ. Li-Cor (Lincoln, USA; Vertrieb Deutschland: Fa. Walz, Effeltrich);

In der Gaswechselkammer wurde während des Versuches eine Temperatur von 17 bis 18 °C gehalten. In Abständen von 1, 3, 7, 13 und 19 Tagen nach Inokulation (dpi) wurden eine gesunde Variante und eine infizierte Variante (vierfache Wiederholung) in der

Gaswechselkammer untersucht. Nacheinander wurden jeweils eine nicht infizierte und eine infizierte Schale gemessen (jeweils 2 Meßwiederholungen pro Schale). Folgende Meßparameter wurden in der Gaswechselkammer erfaßt:

- die CO<sub>2</sub>-Konzentration der zugeführten Frischluft und der Luft im Gaswechselsystem;
- die Temperatur des trockenen und feuchten Thermometers;
- die Temperatur und relative Feuchte der Frischluft;
- die photosynthetisch aktive Photonenflußdichte;
- die Temperatur am Rotameter;
- der Luftdruck;
- die Frischluftrate;
- die CO<sub>2</sub> –Normflußrate;

Bei der Berechnung des CO<sub>2</sub>- Gaswechsels wurde der Wert durch Abzug der Bodenatmung korrigiert. Der Korrekturwert (0,180 µmol/s) wurde durch die vorangegangene Messung einer Aussaatschale ohne Pflanzen bei Versuchsbedingungen ermittelt

Nach der Messung in der Gaswechselkammer wurde die Befallsstärke der jeweiligen Aussaatschale bonitiert, und die genaue Anzahl Pflanzen pro Aussaatschale ermittelt. Die Pflanzen wurden vorsichtig aus den Schalen entnommen, die Wurzeln wurden leicht abgeklopft und von der restlichen Pflanze abgetrennt. Nacheinander wurde die Frischmasse der oberirdischen Pflanzenteile und der Wurzeln ausgewogen. Hiernach wurde die Blattfläche pro Schale mit dem Blattflächenmeßgerät (LI-3100 Area Meter, Fa. LI-COR, Lincoln, USA) gemessen. Sowohl die oberirdischen als auch die unterirdischen Pflanzenteile wurden jeweils in Papiertüten gefüllt und bei 60 °C im Trockenschrank ca. 5-7 Tage getrocknet. Danach konnte die Trockenmasse je Schale ausgewogen werden.

### **3.7. Rassenbestimmung**

#### **3.7.1. Untersuchte Isolate**

Zunächst wurden aus ganz Deutschland Isolate des Pilzes *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* gesammelt. Aus den Anbauregionen Brandenburg, Berlin, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Sachsen und Sachsen-Anhalt konnten Isolate beschafft werden. Auch aus Italien ging ein Isolat in die Untersuchungen mit ein. Zur Rassenidentifikation mit molekular-biologischen Methoden waren zur Einordnung der untersuchten Isolate Referenzisolate notwendig. Diese Isolate konnten von den Rassen Pf2 bis Pf4 und Pf7 beschafft werden.

**Tabelle 2: Kenndaten der untersuchten *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*- Isolate**

Isolat	Isolations- sorte	Erhal- tungs- sorte	Geografische Herkunft	Jahr der Isolation	Isoliert/ ge- sammelt von	td	RAPD PCR
Pf2	-	Medania	-	-	BBA <sup>a</sup>	+	+
Pf3	-	Subito	-	-	BBA <sup>a</sup>	+	+
Pf4	-	Polka	-	-	BBA <sup>a</sup>	+	+
Pf5	-	Bolero	-	-	BBA <sup>a</sup>	+	+
GB1	Ballet	td/Ballet	Brandenburg, Deutschland	1999,	BD <sup>b</sup>	+	+
B1	Spinnacker	Is/td	Berlin, Deutschland	2000	S <sup>c</sup>	+	+
IGLO	-	Is/td	Westfalen, Deutschland	2000	BD <sup>b</sup>	+	+
S1	Chica	Is/td	Sachsen, Deutschland	2000	H <sup>d</sup>	+	+
O1	Bolero	Is/td	Niedersachsen, Deutschland	1998	BBA <sup>e</sup>	+	
BS1	Menito	Is/td	Niedersachsen, Deutschland	1998	BBA <sup>e</sup>	+	
BS2	Matador	Is/td	Niedersachsen, Deutschland	1998	BBA <sup>e</sup>	+	+
BS3	Industra	Is/td	Niedersachsen, Deutschland	1998	BBA <sup>e</sup>	+	+
BS4	Müma	Is/td	Niedersachsen, Deutschland	1998	BBA <sup>e</sup>	+	+
G1	Ballet	Is/td	Brandenburg, Deutschland	2000	BD <sup>b</sup>	+	+
G2	Ballet	Is/td	Brandenburg, Deutschland	2001	BD <sup>b</sup>	+	+
SA	Calata	Is/td	Sachsen-Anhalt, Deutschland	2000	L <sup>f</sup>	+	+
FFO	Lambada	Is/td	Brandenburg, Deutschland	2000	B <sup>g</sup>	+	+
I	San Felix	Is/td	Italien	2002	AG <sup>h</sup>	+	-
ESPL	von GB1	Is	s.o.	2001	BD <sup>b</sup>		(+)

Is: Isolationssorte; td: test differentials; +: Testung durchgeführt; ESPL: Einsporlinie

a: Frau Dr. Szabo, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft/ Kleinmachnow

b: Birte Deil

c: Herr Schmalstieg, Pflanzenschutzamt Berlin

d: Herr Harbrecht, Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

e: Herr Dr. Mattusch, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig

f: Herr Lopez, Landespflanzenchutzamt Sachsen-Anhalt

g: Frau Bartelt, Frau Röder, Landesamt für Ernährung und Landwirtschaft Frankfurt (Oder)

h: Herr Andrea Granier, Unilever, Italien

### 3.7.2. Infektionsversuche

Für die Differenzierung der Isolate im Biotest wurde ein spezielles Testpflanzensortiment der NAK Tuinbouw, Niederlande, verwendet. Dieses bestand aus folgenden Sorten mit den in Tabelle 3 zusammengefaßten Resistenzeigenschaften:

**Tabelle 3: Testpflanzensortiment für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* und ihre Resistenzeigenschaften (nach NAK Tuinbouw, Niederlande)**

Sorte	Resistenzeigenschaften	Pf5	Pf6	Pf7
Winterreuzen	-	+	+	+
Nores	1,2	+	+	+
Califlay	1,3,5	-	+	+
Polka	1,2,3,5	-	+	+
Rushmore	1,3,4,5	-	+	+
Bolero	1,2 x 1,2,3,4	+	+	+
Spinnaker	1,3 x 1,2,3,4,5	-	+	+
Spicer	1,2,3,4 x 1,2,3,4	+	+	+
San Felix	1,3 x 1,2,4,5	-	+	+
Clermont	1,2,3,4 x CMV	+	+	+
Lion	1,2,3,4,5,6,7	-	-	-
Naktuinbouw 12	1,2,3,4,7	+	+	-
SG 6207	1,2,3,4,5,6,7	-	-	-
Eagle	1,2,3,4,(7)	+	+	(-)

Die Sorten Naktuinbouw 12 und SG 6207 waren nicht lieferbar; x: Kreuzung.

Das Testsortiment wurde in 2 Aussaatschalen ausgesät (50x32x6 cm). Jede Schale umfaßte 6 Sorten zu je einer Reihe. Eine Sporangiensuspension der frisch erhaltenen Proben wurde zunächst auf eine Aussaatschale der Isolationssorte und einer Sorte mit entsprechenden Resistenzeigenschaften oder, bei Nichtvorhandensein von Pflanzen dieser Sorten auf ein Testpflanzensortiment, in höchstmöglicher Konzentration aufgesprüht. Danach wurden die Pflanzen für 24 Stunden unter Infektionsbedingungen (10°C; 98% rel. Feuchte; dunkel) aufgestellt. Folgende Kulturbedingungen wurden während der weiteren Anzucht eingestellt: 15/10°C; 16/8 h; 85/98% rel. Luftfeuchte; Licht: 40%. Nach abgelaufener Inkubationsphase und bei einsetzenden Symptomen wurden die Pflanzen wiederum unter Sporulationsbedingungen aufgestellt. Das frisch sporulierende Pilzmaterial wurde mit aqua



dest. abgepinselt. Jeweils 10 ml der Sporangiensuspension pro Schale wurden dann mit einem Reagenzglaszerstäuber (Merck Eurolab, Berlin) auf das Testsortiment aufgesprüht. Die Konzentration der Sporangienlösung wurde auf ca.  $7 \times 10^4$  Sporangien/ml eingestellt.

Die inokulierten Schalen wurden ebenfalls, wie oben beschrieben, bis zur Symptomausprägung weiterkultiviert. Bei ersten Anzeichen von Symptomen (helle Flecken auf den Blättern) wurden die Schalen wieder optimalen Sporulationsbedingungen unterzogen. Danach wurde bonitiert, welche Sorten des Testpflanzensortiments eindeutige Sporulationserscheinungen des Erregers aufwiesen (ja/nein Entscheidung). Diese Bonitur wurde nach mehreren Tagen nochmals wiederholt. Über den Vergleich mit den Resistenzangaben der einzelnen Sorten konnte dann die jeweilige Rasse ermittelt werden.

### **3.7.3. Optimierung der RAPD- Methodik für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae***

Die methodischen Untersuchungen wurden alle mit dem Standardisolat GB1 durchgeführt. Getestet wurden jeweils alle unter 3.7.3.7 charakterisierten 6 Primer.

#### **3.7.3.1. Produktion von Sporangienmaterial**

Die allgemeine Anzucht der Pflanzen, die Inokulation mit Falschem Mehltau und die Weiterkultivierung erfolgten wie in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben. Beim Abpinseln der Befallsstellen, die eine Sporulation des Pilzes aufwiesen, wurde darauf geachtet, daß nur von oberen befallenen Blättern abgepinselt wurde und nicht von solchen, die am Boden mit der Pflanzenerde in Berührung kamen. Auch offensichtlicher Schmutz wurde beim Abpinseln vermieden.

Zur semi-sterilen Anzucht wurden mehrere Verfahren untersucht:

1. Pflanzen wurden in Arbeitskisten pikiert, die mit schwarzem Vlies abgedeckt waren und weiterkultiviert;
2. Pflanzen wurden in mit Folie abgedeckten Arbeitskisten pikiert und weiterkultiviert;
3. Pflanzen wurden in Perlit in Grodanblöcken pikiert und weiterkultiviert. Die Anzucht sowohl vor als auch nach der Infektion erfolgte einheitlich bei 15/10°C im Gewächshaus. Alle Pflanzen wurden im zweiten Laubblattpaarstadium infiziert;
4. Blätter wurden auf feuchtes Filterpapier (Durchmesser 9 cm; Fa. Neolab, Heidelberg) in Glaspetrischalen ausgelegt und infiziert. Die Aufstellung erfolgte im Kühlbrutschrank BK 6160 (Fa. Heraeus, Hanau) bei 15/10°C bei 16/8 Stunden Tag/Nacht;

Als geeignet erwies sich die Methode 4; allerdings war auch hier, im Vergleich zu der allgemeinen Vermehrung, die Sporenausbeute relativ gering.

### 3.7.3.2. Vorbereitung der DNA

Es wurden zunächst unterschiedliche Verfahren untersucht, mit denen man die Sporenhülle der Mehltausporangien in einem ersten Schritt zerstören kann:

- Vorkeimen der konzentrierten Sporenlösung über Nacht bei 10°C (PIETREK UND ZINKERNAGEL 2002);
- Behandlung mit Glaskügelchen (Durchmesser: 0,25-0,5 mm; Verhältnis Sporenmenge/ Glaskügelchen 1:1): 7 min bei 30/s in einer Retsch Typ MM 200 Schwingmühle (Fa. Retsch, Haan);

Es wurden daher folgende Varianten der DNA-Vorbereitung miteinander verglichen:

- In dest. Wasser/ Lysispuffer abgepinselt; 3x gewaschen;
- In dest. Wasser/ Lysispuffer abgepinselt; 3x gewaschen VK;
- In dest. Wasser/ Lysispuffer abgepinselt; 3x gewaschen GK;
- In dest. Wasser/ Lysispuffer abgepinselt; 3 x gewaschen VK; GK;

Es wurde deutlich, daß die Variante 4 (dest. Wasser) die besten Bandenergebnisse erzielt.

Alle weiteren Untersuchungen setzen also folgende Vorbehandlung der Sporenlösung voraus:

- 3x durch einen Nylonstrumpf gefiltert;
- 3x waschen: 5 min 1500g, Überstand abnehmen;
- Keimung der Sporen über Nacht bei 10°C und Dunkelheit;
- Mörsern in einer Schwingmühle (7 min 30/s) mit Glaskugeln.

### 3.7.3.3. DNA Extraktion

Zur Extraktion der pilzlichen DNA wurde die Methode nach HERING (1997) verwendet. Hierbei wird eine phenolfreie Extraktion möglich. Folgende Schritte wurden dazu durchgeführt:

- Dem Sporenpellet wurden 50 µl Lysispuffer und Glaskugeln hinzugefügt (entsprechend der Masse an Sporenmasse) und die Masse 7 min (30/s) in der Schwingmühle gemörsert. Die restlichen 950 µl Lysispuffer wurden hinzugefügt;
- 30 min lysieren lassen bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler;
- Zugabe von 120 mg NaCl (lösen durch Schütteln) und Überkopfschüttler auf Eis für 30 min;
- Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm;
- Überstand in neue Reaktionsgefäße und nochmals 10 min bei 13000 rpm;

- Überstand mit 120 mg PEG 2000 gelöst;
- 60 min Überkopfschüttler auf Eis;
- danach 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen;
- Reaktionsgefäße vorsichtig kopfüber auf Fließpapier aufgestellt, so daß Reste der PEG Lösung herauslaufen können;
- nach ca. 5 min Zugabe von 250 µl TEL Puffer; nach einigen Minuten vollständig durch Überkopfschütteln oder durch Fingerschnipsen lösen;
- Zugabe von 1000µl eiskaltem Isopropanol;
- zur vollständigen Präzipitation weitere 30 Minuten im Überkopfschüttler auf Eis;
- 5 min bei 3500 rpm abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig verwerfen;
- Umgekehrtes Aufstellen der Reaktionsgefäße auf Fließpapier für 5min; Sediment mit dem Concentrator 5301 (Fa. Eppendorf, Hamburg) trocknen lassen;
- Zugabe von 50 µl TE - Puffer und Kühlschrank bei 4°C.

Die zwei Extraktionsmethoden: HERING (1997) und E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurden, hinsichtlich der generellen Extraktionsgüte pilzlicher DNA und der Extraktionsgüte von Pilzmaterial, aus der infizierten Pflanze miteinander verglichen. Die folgenden 3 Proben wurden nach jeder Methode extrahiert:

- Gesundes Pflanzenmaterial;
- Infiziertes Pflanzenmaterial;
- Reines Pilzmaterial.

Durch Abpinseln wurden 20 ml einer Sporangiensuspension (Konzentration:  $8 \times 10^5$  Sporen/ml) erhalten. Diese wurden auf 20 1-ml-Eppendorftubes verteilt. Zur Keimung wurde die Lösung über Nacht bei 10°C aufgestellt. Hiernach wurde die Sporangiensuspension zentrifugiert (6300rpm; 5 min), der Überstand verworfen und pro Eppendorftube 5µl homogenisiertes Pflanzenmaterial hinzugegeben. Zehn Proben wurden nach HERING 1996 extrahiert und 10 Proben mit dem kommerziellen Kit. Nach der Extraktion wurde die DNA von allen Proben gemessen, und eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 3.7.3.4. Vergleich der Mengen an extrahierter pilzlicher DNA

Ausgehend von den unter 3.7.3.3 beschriebenen Ergebnissen wurden je 3 repräsentative Proben ausgewählt, und die unverdünnte DNA dieser Proben für eine PCR- Reaktion

verwendet. Die Primer, die bei dieser PCR eingesetzt wurden, wurden bei der Klassifizierung von Oomyceten eingesetzt (COOKE ET AL. 2000).

Als Erregernachweis wurde bei der anschließenden Gelelektrophorese eine spezifische Bande sichtbar. Diese ermöglichte einen spezifischen Nachweis für den Pilz, da die Blätter nur mit *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* infiziert worden waren. Gleichzeitig konnte über eine Verdünnungsreihe ( $10^1$ - $10^{12}$ ) die Menge an pilzlicher DNA, die extrahiert worden war, größenordnungsmäßig bestimmt werden.

Die verwendeten Primer waren: ITS4 und ITS6 (COOKE ET AL. 2000).

**Tabelle 4. Reaktionsmix für den Vergleich extrahierter DNA-Mengen**

	Für eine Probe (25 µl)
H <sub>2</sub> O	13,15
Puffer	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,0
DxTPs	1,0
PITS4	0,25
PITS6	0,25
Glycerin	1,25
Taq	0,1
DNA	2,0

Der Thermocycler wurde nach GROTE ET AL. (2002) programmiert: der Denaturierung (95°C /3 min) folgten 37 Amplifikationszyklen (94°C /30 s, 50°C /30s, 72°C /1 min) und abschließend 10 min bei 72°C.

### 3.7.3.5. RNA-Verdau

Zur Untersuchung der Notwendigkeit eines RNA- Verdau wurden zwei Proben des Isolates GB 1 nach der Methode von HERING (1997) extrahiert, wobei bei einer Probe der zusätzliche Schritt des RNA Verdau vor der Fällung der DNA mit eiskaltem Isopropanol eingefügt wurde: Zugabe von 25 µl RNase Lösung; 30 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.7.3.6. Optimale DNA-Konzentration für PCR

Mit zwei Proben des Isolates GB1 wurde die, für PCR notwendige, DNA-Menge ermittelt.

Nach Messung der DNA mit Spektralphotometer ergaben sich folgende DNA Gehalte:

Probe 1: 8960 ng/µl;

Probe 2: 10230 ng/µl.

Die Verdünnungsstufen  $10^1$  bis  $10^7$  dieser beiden Proben gingen in die PCR mit ein.

Nach der PCR erfolgte die Gelelektrophorese. Die besten Bandenergebnisse wurden bei einer Verdünnung von 1:100 erzielt, also etwa bei einer Konzentration von größenordnungsmäßig 100 ng/µl in der PCR. Diese Konzentration wurde bei allen weiteren Versuchen für die PCR eingestellt.

### 3.7.3.7. Verwendete Primer

Alle Untersuchungen wurden mit den folgenden sechs Primern durchgeführt und wiederholt:

**Tabelle 5: Verwendete Primer**

Primer-Nr.	Sequenz 5`-3`	Anzahl Basenpaare	GC-Gehalt	Annealing Temperatur
Primer für <i>Fusarium</i> spp. HERING (1997)				
1	CAG CAG GTC GAT GCG	15	67%	53°C
2	GCG CAT GAC TGG CAG	15	67%	53°C
Primer für <i>Bremia lactucae</i> (GROTE 2000, mündliche Mitteilung)				
3	GTG CAC CTC GAC GCG	15	67%	53°C
4	GAG CAC GAC CTG CAG	15	67%	53°C
5	GTG CTG CTG CTC GCG	15	73%	53°C
6	GTG GAG CTG CTC GCG	15	73%	53°C

### 3.7.3.8. PCR-Bedingungen

Zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde in einer weiteren Untersuchung eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen der Einflußfaktoren dNTP und MgCl<sub>2</sub> angesetzt (Tabelle 6). Die optimale Konzentration des MgCl<sub>2</sub> ist von Bedeutung, da eine hohe MgCl<sub>2</sub>-Konzentration den Ertrag an amplifizierten Produkten erhöht, die Spezifität dabei jedoch sinkt. Bei einer niedrigen MgCl<sub>2</sub>-Konzentration steigt zwar die Spezifität, jedoch nimmt der Ertrag ab (WILLIAMS ET AL. 1993; EDEL 1998). Mit der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration hängt auch die Desoxynukleosid-Triphosphate-Konzentration zusammen. Die Magnesium-Konzentration sollte immer 0,5 - 2,5 mM über der dNTP-Konzentration liegen, da deren negative Ladungen Mg<sup>2+</sup>-Ionen binden. Die Konzentration an dNTPs sollte ausgewogen und mit der Mg<sup>2+</sup> Konzentration abgestimmt sein, um eine hohe Lesegenauigkeit zu erzielen und Fehleinbauten zu vermeiden (GOLLER ET AL. 1998).

**Tabelle 6: Optimierung der PCR-Bedingungen**

Varianten:		
	Menge 1Probe	Endkonz.
H <sub>2</sub> O bidest	16,93/16,68/16,18	
PCR Puffer (10x)	2,5µl	1,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP (10mMol)	0,5µl	200µM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,07µl	0,35U
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0/0,25 /0,75 µl	0/0,5/1,5 mM
Primer	2,5µl	1µM
	22,5µl	
DNA	2,5 µl	
	25,00 µl	

	Menge 1Probe	Endkonz.
H <sub>2</sub> O bidest	16,43/16,18/15,68	
PCR Puffer (10x)	2,5µl	1,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP (10mMol)	1µl	400µM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,07µl	0,35U
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0/0,25/0,75 µl	0/0,5/1,5 mM
Primer	2,5µl	1µM
	22,5µl	
DNA	2,5 µl	
	25,00 µl	

	Menge 1Probe	Endkonz.
H <sub>2</sub> O bidest	15,93/15,68/15,18	
PCR Puffer (10x)	2,5µl	1,5mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP (10mMol)	1,5	600µM
Taq Polymerase (5U/µl)	0,07µl	0,35U
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0/0,25/0,75 µl	0/0,5/1,5 mM
Primer	2,5µl	1µl
DNA Proben	2,5 µl	
	25µl	

Der Thermocycler zur PCR wurde nach GROTE (2000, mündliche Mitteilung) programmiert: der Denaturierung (95°C /10 min) folgten 37 Amplifikationszyklen (95°C /0,45 min, 53°C /1,00 min, 72°C /1,30 min), und abschließend 5 min bei 75°C. Danach wurden die Proben im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

### 3.7.3.9. Gelelektrophorese und Auswertung

Zur Ergebnisdarstellung wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde mit TBE Puffer (HERING 1997) ein Agarosegel (1,4 %) hergestellt. Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde der Marker λDNA-Hind III/φX174 DNA-Hae III Mix eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für 90 Minuten auf 150V eingestellt (Power pack P25, Fa. Biometra, Göttingen). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für ca. 20-30 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung gelegt (11 TBE; 53 µl Ethydiumbromid). Die Sichtbarmachung und Dokumentation der Banden erfolgte anschließend mit einem Transilluminatorsystem Bio-Imaging-Control-Software Argus X1 (Fa. Biostep Labor-und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf) unter UV Licht (254 nm). Die Auswertung wurde mit der Software Phoretix 1D Advanced 4.00 (Fa. Biostep Labor-und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf) durchgeführt.

### 3.7.3.10. Latenznachweis von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in der Pflanze

Es wurden 4 Aussaatschalen mit Spinat der Sorte Ballet im Gewächshaus angezogen (s. 3.3.1). Zum Entwicklungsstadium BBCH 102 bis 103 wurden die Pflanzen zweier Aussaatschalen mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* inokuliert (s. 3.3.3). Die anderen zwei Schalen wurden als Kontrolle weiterkultiviert. Es erfolgte eine tägliche Probenahme, die

jeweils vier gesunde und vier inokulierte Blätter umfaßte, bis die Sporulation des Erregers erfolgte. Von diesen Blättern wurden pro Variante zwei Mischproben erstellt. Eine Extraktion erfolgte, wie in den Abschnitten 3.7.3.2 und 3.7.3.3 beschrieben. Anschließend wurde eine PCR nach GROTE (2002) (s. 3.7.3.3) und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

### **3.7.4. Schnelltest für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae***

#### **3.7.4.1. Abpinseln auf dem Feld**

Es wurden mehrere Befallsstellen von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* nach dem vorhandenen Boniturschema bonitiert und der Anteil befallener Blattfläche (%) ermittelt. Anschließend wurden diese definierten Befallsstellen jeweils in 1 ml dest. Wasser abgepinselt. Die Konzentration der Sporangienlösungen wurde mit der Thomakammer bestimmt.

#### **3.7.4.2. Lagerung von Sporangienmaterial**

Es wurde auf die vorliegende Methode zur Lagerung von Sporen für die Vermehrung zurückgegriffen. Dazu wurden Befallsflächen, die Sporulation des Erregers aufwiesen, von Spinatblättern ausgeschnitten und ca. einen Tag bei trockener warmer Zimmerluft getrocknet. Anschließend wurden diese Trockenproben für mindestens 1 Monat bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die gefrorenen Trockenproben wurden dann in aqua dest. Geschwenkt, somit eine Sporangiensuspension hergestellt. Diese wurde extrahiert, einer RAPD-PCR unterzogen und mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

#### **3.7.4.3. Extraktionsvereinfachung**

Zur Klärung, ob die zeit- und arbeitsaufwendige DNA- Extraktion vereinfacht werden könnte, wurde das Sporenmaterial nach dem Zerkleinern direkt zur PCR- Reaktion hinzugegeben. Extraktion und Reinigung der DNA wurden somit ausgelassen. Die Vorbehandlung des Sporenmaterials erfolgte wie unter 4.5.1.2.2. beschrieben.

#### **3.7.4.4. Lagerung der extrahierten DNA**

Es wurden 56 ml Sporenlösung abgepinselt. Die Konzentration der Sporenlösung wurde ermittelt; sie lag im Bereich  $10^4$ . Die Lösung wurde dreimal gewaschen, danach wieder ausgezählt und jeweils 2 ml in 2-ml-Eppendorftubes gefüllt. Die Lösung wurde zum Vorkeimen über Nacht bei  $10^{\circ}\text{C}$  dunkel aufgestellt. Am nächsten Tag wurden 4 Proben sofort extrahiert (nach HERING 1997). 26 Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und 26 Proben bei



-80 °C eingefroren. Jeweils 2 Proben wurden nach 14 Tagen, 1 Monat, 3 Monaten, 6 Monaten, 9 Monaten und 12 Monaten entnommen und extrahiert. Der DNA-Gehalt wurde bei allen Proben ermittelt. Anschließend wurden PCR und Gelelektrophorese durchgeführt.

### **3.7.5. Untersuchung der vorliegenden Isolate**

Für die Auswertung der gesammelten Isolate aus Deutschland wurden die methodischen Ergebnisse, die zur Optimierung der RAPD für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* führten, verwendet. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Software Phoretix 1D Advanced 4.00 (Fa. Biostep Labor-und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf). Dendrogramme wurden unter der Verwendung des UPGMA Algorithmus und der Dice Differenzen erstellt.

### **3.8. Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde das Programm Statistica 6.0 (StatSoft Inc. Tulsa, Oklahoma, USA) verwendet.

Bei den Infektionsversuchen unter kontrollierten Bedingungen waren die Versuche komplett randomisiert und in 4-facher Wiederholung angelegt. Zunächst wurde die Normalverteilungsannahme geprüft. Wurde diese abgelehnt, so wurde eine Transformation der Daten durchgeführt. Es wurde dabei auf die inverse Sinustransformation ( $\arcsin \sqrt{x/100}$ ) und die Wurzeltransformation zurückgegriffen. Bei den Untersuchungen der relativen Häufigkeiten wurde generell eine Sinustransformation durchgeführt (WEBER 1980). Weiterhin wurde entsprechend der Versuchsanordnung die einfaktorielle oder mehrfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden wurde der Fisher LSD Test verwendet, wobei das Signifikanzniveau bei  $\alpha = 0,05$  festgelegt wurde. Bei den Versuchen zur Infektion wurden die stückweise lineare Regressionen und die nichtlineare Regression durchgeführt (Signifikanzniveau bei  $\alpha = 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Datenerhebung Wachstum Spinat

Bei der Datenerhebung zum Wachstum der Spinatpflanzen konnte die Entwicklung verschiedener Wachstumsparameter in wöchentlichem Abstand verfolgt werden. So ist in Abbildung 2 die Entwicklung der Blattfläche pro Quadratmeter dargestellt. Der Verlauf der Blattflächenentwicklung ist bei den 5 Sätzen ähnlich. Lediglich die Messung am Tag 202 /Satz 3 ist als Ausreißer zu werten, welches durch die extrem hohe Standardabweichung ( $s$ ) belegt wird. Eine Blattfläche von ca. 8 bis 15  $m^2$  pro  $m^2$  Anbaufläche wurde im Jahr 2000 bei allen Sätzen zur Ernte erreicht. Ein Einfluß der Jahreszeit beim Wachstumsverlauf der Spinatpflanzen ist nicht zu erkennen.

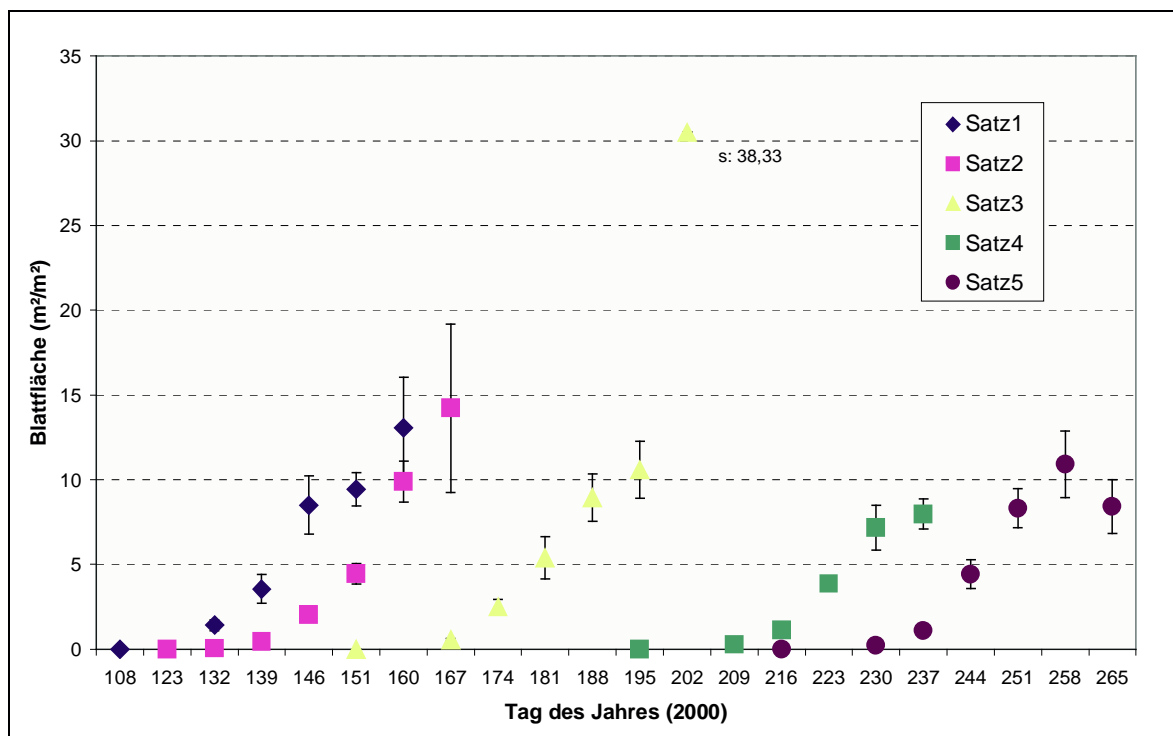


Abbildung 2: Entwicklung der Blattfläche ( $m^2/m^2$ ) bei 5 Sätzen Spinat (Jahr 2000); Balken: Standardabweichung;  $s$ : Standardabweichung Tag 202

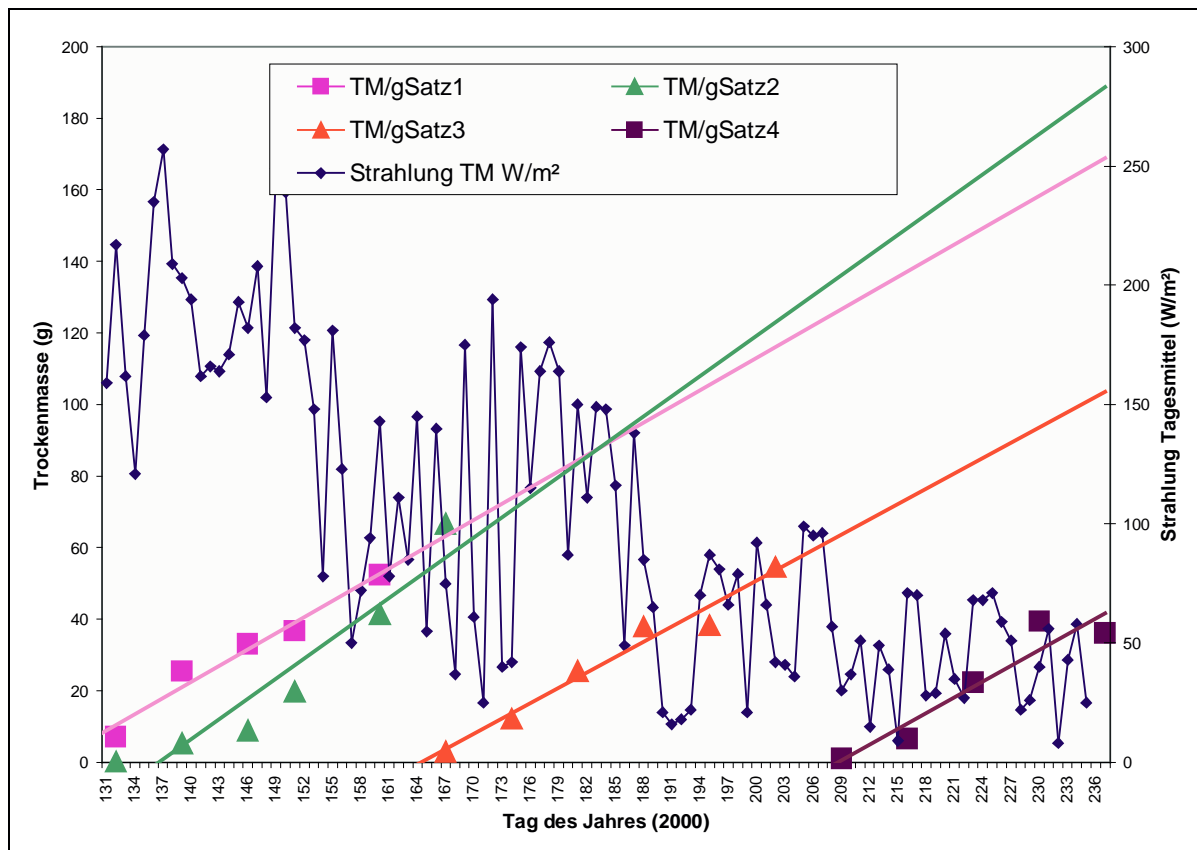
Als Langtagspflanze reagiert Spinat im Sommer mit schnellerem Wachstum und schnellerer Schoßbildung. Diese Tageslängenreaktion wird durch höhere Temperaturen gefördert. Die Stärke dieser photoperiodisch-thermischen Reaktion ist jedoch auch sortenabhängig. Bei der für die Untersuchungen verwendeten Sorte „Ballet“ ist diese Reaktion kaum auszumachen. Betrachtet man den jeweiligen Erntetermin bei den 5 dargestellten Spinatsätzen, so erkennt man im Zeitraum April bis Oktober keine großen zeitlichen Unterschiede; der Erntetermin liegt etwa bei 35 Tagen nach Auflaufen des Bestandes (Tabelle 7). Beim Herbstsatz 5 konnte kein Schossen des Bestandes ausgemacht werden, der Erntetermin konnte allerdings ermittelt

werden, da es nach 36 Tagen zu keinem Zuwachs an Frischmasse mehr kam. Auch bei den Schossterminen lassen sich keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Sätzen ausmachen. Eine Ausnahme stellt der Satz 5 dar, bei dem es, bis der Versuch beendet werden mußte, nicht zum Schossen kam.

**Tabelle 7. Erntetermin und Schosstermin bei 5 Sätzen Spinat (2000)**

<b>Satz</b>	<b>Erntetermin (Tag des Jahres)</b>	<b>Schosstermin (Tag des Jahres)</b>	<b>Anzahl Tage vom Auflaufen bis zur Ernte</b>	<b>Anzahl Tage bis vom Auflaufen bis zum Schossbeginn</b>
1	151	Zwischen 151 und 160	34	>34
2	167	>167	35	>35
3	188	195	35	35
4	230	237	31	38
5	258	nicht eingetreten	36	nicht eingetreten

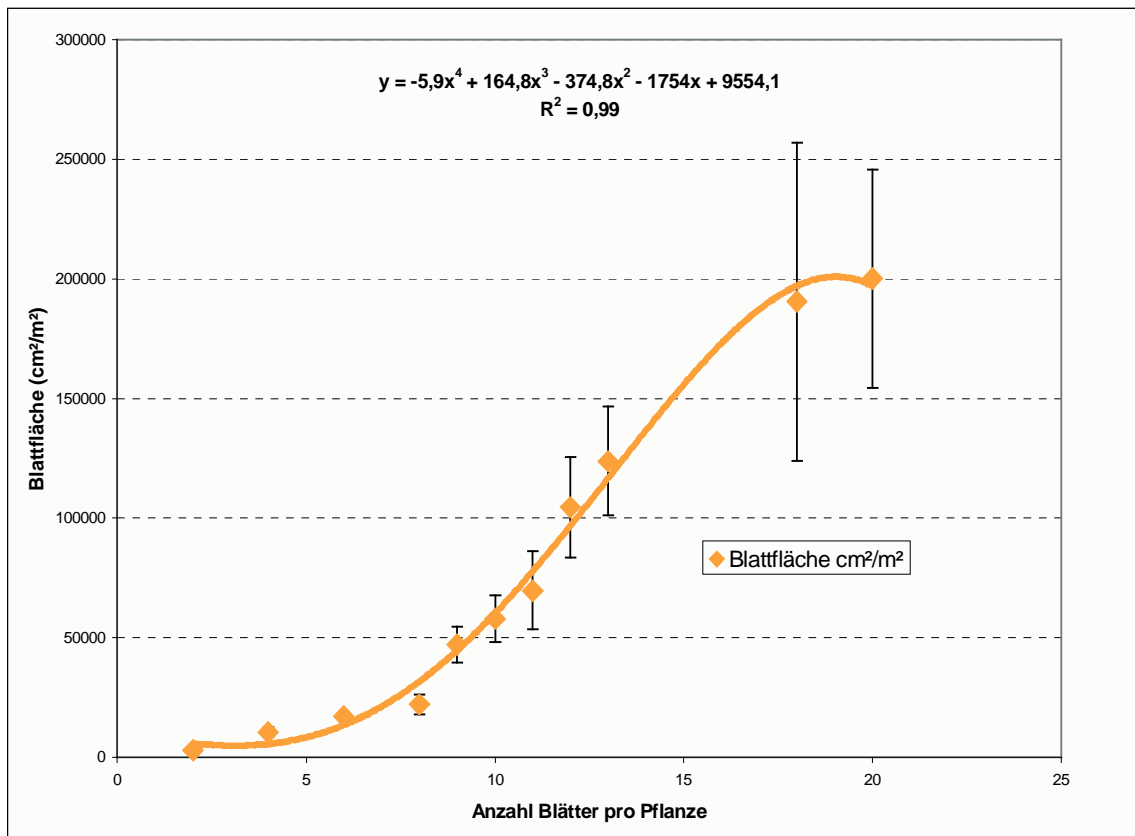
Die Beziehung zwischen Wachstum und Strahlung wird in Abbildung 3 verdeutlicht, denn beispielhaft ist hier die Entwicklung der Trockenmasse bei 4 Spinatsätzen im Jahr 2000 in Bezug zur Strahlung dargestellt. Die Strahlung ist als jeweiliger Tagesmittelwert abgebildet und liegt im Frühjahr und Frühsommer des Jahres wesentlich höher (im Bereich 50 bis 250 W/m<sup>2</sup>) als im Spätsommer und Herbst (im Bereich 10 bis 100 W/m<sup>2</sup>). Trotz der unterschiedlichen Strahlung zeigt sich bei allen Sätzen, wie es auch schon für die Entwicklung der Blattfläche (s. Abbildung 2) festgestellt werden konnte, eine ähnliche Entwicklung unabhängig von der Strahlung. Die eingezeichneten Trendlinien zeigen jeweils eine ähnliche Steigung (vgl. hierzu auch A.1.).



**Abbildung 3: Trockenmasseentwicklung (g) in Bezug zur Strahlung ( $W/m^2$ ) bei 4 Sätzen Spinat (Jahr 2000); TM/g: Trockenmasse in Gramm; TM  $W/m^2$ : Tagesmittel der Strahlung**

Die gewonnenen Daten fließen in ein Wachstumsmodell für Spinat mit ein (FINK 2002, mündl. Mitteilung). Für die vorliegende Arbeit ist die Datenerhebung zum Wachstum der Spinatpflanze insoweit von Bedeutung, da sie die Grundlage für das entwickelte Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* bildet. Mit Hilfe des leicht ermittelbaren Entwicklungsstadiums eines Spinatbestandes soll schließlich die Blattfläche bestimmt werden, die einem hohen Schätzfehler unterliegt.

Zunächst wurde jeweils der Blattflächenmittelwert von vier Proben pro Entwicklungsstadium ermittelt. Dieser Wert wurde durch den Mittelwert der Anzahl Pflanzen pro laufenden Meter geteilt. Das Ergebnis war die durchschnittliche Blattfläche pro Pflanze zu dem jeweiligen Entwicklungsstadium. Multipliziert mit der Anzahl Pflanzen pro  $m^2$  (300) ergab das eine Angabe zur vorhandenen Blattfläche auf einem Quadratmeter. Um eine Formel für die Blattfläche bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu bekommen, wurde mit den vorhandenen Werten eine Ausgleichsfunktion ermittelt. Die beste Anpassung erhielt man mit einer polynomischen Funktion 4. Ordnung (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4: Mittelwert der Blattfläche (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium; Balken: Standardabweichung**

Mit Hilfe dieser Funktion können Werte für die Blattfläche (cm<sup>2</sup>) pro m<sup>2</sup> bei Spinat der Sorte „Ballet“ errechnet werden (Tabelle 8). Werden diese Werte durch die Anzahl Blätter pro m<sup>2</sup> geteilt, ergibt das eine durchschnittliche Angabe zur Blattfläche (cm<sup>2</sup>) pro Blatt in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. Dieser Wert ist die Grundlage für das Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*, die eine Umrechnung, der bei der Oberflächenbonitur ermittelten Befallswerte in tatsächlich befallene Blattfläche, erlaubt (s. Abschnitt 4.2.1). Gleichzeitig können Angaben zur gesamten Blattfläche des zu untersuchenden Bestandes gemacht werden, so daß Aussagen zur Befallsstärke des Gesamtbestandes getroffen werden können.

**Tabelle 8: Ermittlung der durchschnittlichen Blattfläche pro Blatt**

Anzahl Blätter	Blattfläche (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	Anz. Blätter/m <sup>2</sup>	Blattfläche/Blatt (cm <sup>2</sup> )
3	4890	900	5,4
4	5575	1200	4,6
5	8319	1500	5,5
6	13473	1800	7,5
7	21244	2100	10,1
8	31699	2400	13,2
9	44763	2700	16,6
10	60219	3000	20,1
11	77708	3300	23,5
12	96729	3600	26,9
13	116639	3900	29,9
14	136654	4200	32,5
15	155847	4500	34,6
16	173150	4800	36,1
17	187352	5100	36,7
18	197102	5400	36,5
19	200905	5700	35,2
20	197126	6000	32,9

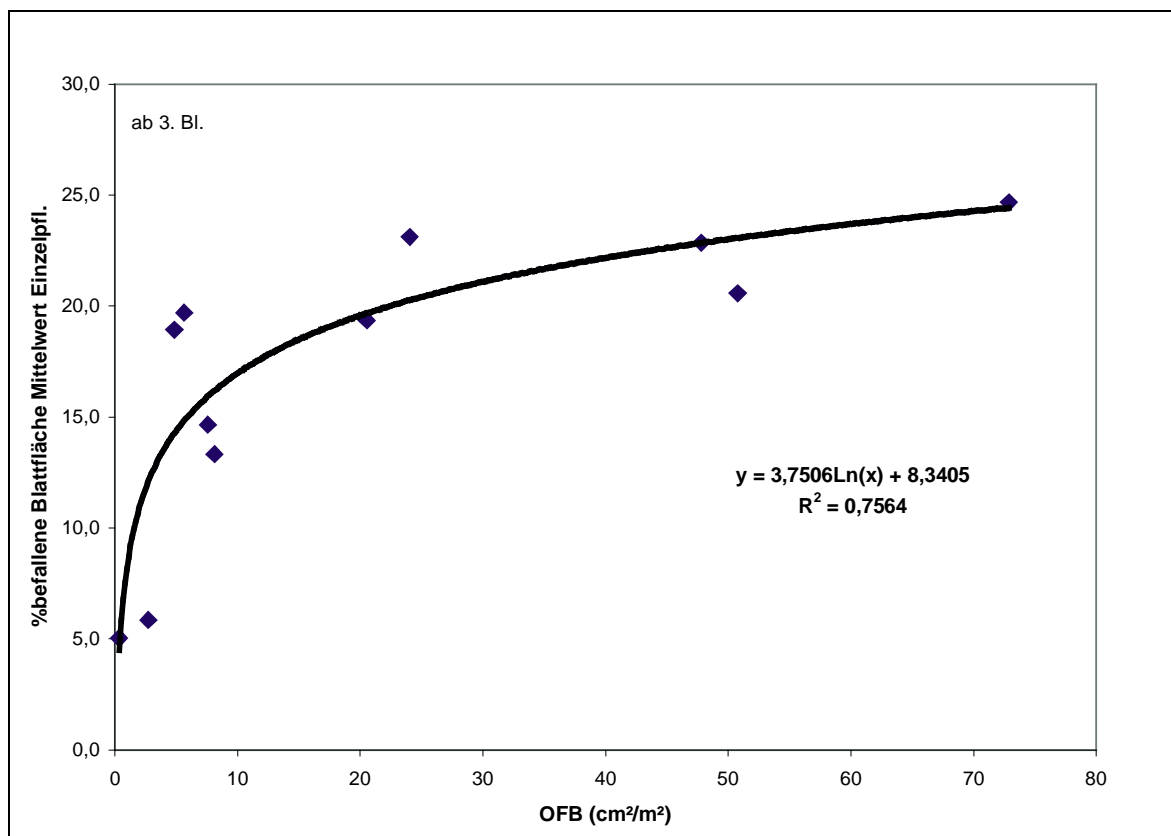
## 4.2. Pathogenese

### 4.2.1. Entwickeltes Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*

Ein leicht einsetzbares Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* wurde zunächst im Rahmen der Untersuchungen entwickelt. Mit einer Bonitur des Entwicklungsstadiums des Bestandes und einer Oberflächenbonitur des Erregerbefalls im Bestand (Ermittlung der Anzahl Blätter pro Befallsklasse) kann die Befallsstärke im Bestand berechnet werden. Hierzu wurde als erstes Ergebnis mit Hilfe der Bildanalyse eine Befallsschablone für die einzelnen Befallsklassen erstellt, die im Anhang dargestellt ist (A.6.). Mit Hilfe dieser Schablone kann der zu untersuchende Bestand bis zum Bestandesschluß bei der hier untersuchten Bestandesdichte (bei den vorliegenden Untersuchungen bei BBCH 109-110) bewertet werden, und eine direkte Umrechnung der Boniturwerte (%) in befallene Blattfläche (cm<sup>2</sup>) kann erfolgen. Als weitere Angaben sind dazu lediglich Aussagen zur Blattfläche eines Blattes (cm<sup>2</sup>) und eines Quadratmeters des Bestandes notwendig, die aus den

Untersuchungen zum Wachstum des Spinates gewonnen werden konnten (s. Abbildung 4, Tabelle 8).

Ab dem Entwicklungsstadium BBCH 109-110 kann nur der Befall an der Oberfläche eines Bestandes mit dem Boniturschema geschätzt werden. Um als zweites Ergebnis zur Boniturschemaentwicklung den Befall mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* im gesamten Bestand zu bestimmen, wurde der Zusammenhang zwischen den bei der Oberflächenbonitur (OFB) erzielten Werten und den Durchschnittswerten komplett bonitierter Pflanzenstichproben ermittelt, der in Abbildung 5 dargestellt ist. Um den besten Zusammenhang zu erzielen, wurden die Berechnungen ab unterschiedlicher entwickelter Laubblätter durchgeführt. Beim ermittelten Zusammenhang zeigte sich, daß dieser sich verbessert, wenn sich das Blatt höher im Bestand befindet, wie z.B. ab dem fünften Blatt. Hierbei wird allerdings ein Teil des Befalls, der sich auf den unteren Blättern befindet, nicht berücksichtigt. Es wurde sich daher für eine Berechnung ab dem dritten Blatt entschieden. Mit Hilfe dieser Umrechnung konnte nun bei weiteren Bonituren ab dem Entwicklungsstadium BBCH 109-110 eine Berechnung des Gesamtbefalls erfolgen.



**Abbildung 5: Zusammenhang zwischen der Oberflächenbonitur (OFB) und dem Mittelwert der Einzelpflanzen (% befallene Blattfläche) der untersuchten Pflanzenstichproben; Korrelation ab dem 3. Blatt**

Als Gesamtergebnis für die Boniturschemaentwicklung kann folgende Vorgehensweise für die Berechnung der befallenen Blattfläche bei Freilandbonituren festgelegt werden:

Grundlage: die durchschnittliche BF/Blatt ( $\text{cm}^2$ ) zum Entwicklungsstadium zum jeweiligen Boniturtermin (s. Abbildung 4, Tabelle 8)

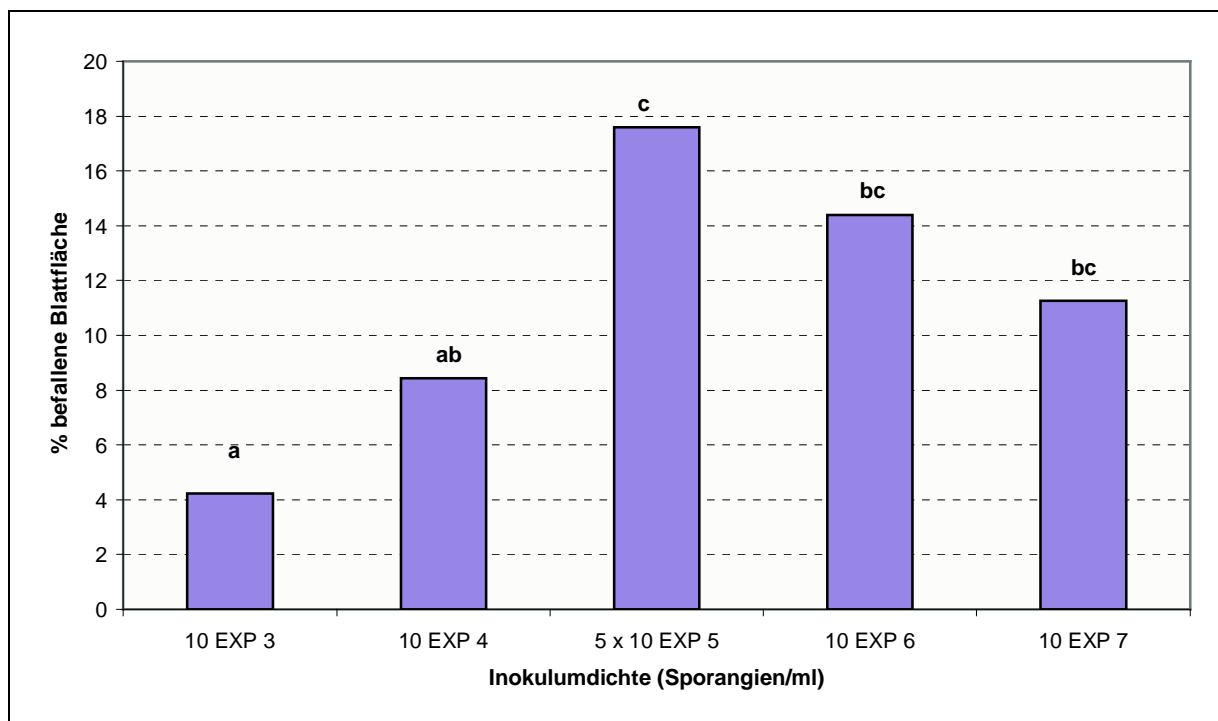
1. Ermittlung der Befallsklassen im Feld
2. Berechnung der befallenen Blattfläche für die OFB auf Befallsklassenbasis
3. Berechnung der befallenen Blattfläche pro Einzelpflanze (s. Abbildung 5)
4. Berechnung der Blattfläche pro  $\text{m}^2$
5. Berechnung der befallenen Blattfläche pro  $\text{m}^2$
6. Berechnung der befallenen Blattfläche des bonitierten Feldes insgesamt

Zu beachten ist hierbei, daß die Punkte 3,4 und 5 ab einem Entwicklungsstadium BBCH 109-110 durchgeführt werden.



#### 4.2.2. Einfluß von Inokulumkonzentration und Zeit auf die Befallsstärke

Zur Durchführung von Infektionsversuchen unter kontrollierten Bedingungen war es zunächst notwendig, Aussagen zur Befallsstärke bei unterschiedlichen Inokulumkonzentrationen zu treffen (Abbildung 6). Der Mittelwert der befallenen Blattfläche bei einer Inokulumkonzentration von  $10^3$  Sporangien/ml liegt bei etwa 4,5% und unterscheidet sich signifikant von den bei höheren Inokulumkonzentrationen ( $5 \times 10^4$ ,  $10^5$  und  $3 \times 10^5$ ) erzielten mittleren Befallswerten (18, 14 und 12 %). Zu einem stärkeren Befall kommt es bei Konzentrationen zwischen 5 und  $10 \times 10^4$  Sporangien/ml. Bei weiteren Infektionsversuchen wurde deshalb die Konzentration der Inokulumsuspension immer im Bereich 5 bis  $10 \times 10^4$  eingestellt.



**Abbildung 6: Befallene Blattfläche in Abhängigkeit von der Inokulumdichte; LSD-Test ( $\alpha = 0,05$ ); Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Inokulumkonzentrationen**

Weiterhin wurde geprüft, ob die Inokulumkonzentration einen Einfluß auf die Latenzphase des Erregers hat. Für die Inokulumkonzentrationen  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Sp./ml wurde dieses gleichzeitig bei 4 Temperaturvarianten (10/5; 15/10; 20/15; 25/20 °C) untersucht. Einen Überblick über die verhältnismäßige Dauer (d) bis zur ersten Sporulation liefert die Tabelle 9.

**Tabelle 9: Latenzperiode (d) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Inokulumkonzentration**

Temperatur (°C)	Konzentration (Sporangien/ml)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
10/5	9 d	7 d	7 d
15/10	7 d	6 d	6 d
20/15	7 d	6 d	6 d
25/20	größer 9 d	6 d	7 d

Die Entwicklung bei der niedrigen Inokulumkonzentration von 10<sup>3</sup> ist langsamer als bei den höheren Inokulumkonzentrationen. Die Latenzphase verzögert sich unabhängig von der Temperatur um 1-2 Tage. Zwischen den Konzentrationen 10<sup>5</sup> und 10<sup>4</sup> Sporangien/ ml ist kein Unterschied in der Latenzperiode auszumachen. Die rascheste Entwicklung und somit kürzeste Latenzperiode wird bei Temperaturen im Bereich 15/10 °C und 20/15 °C erreicht.

### **4.2.3. Pathogenese unter kontrollierten Bedingungen**

#### **4.2.3.1. Infektion**

##### **4.2.3.1.1. Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur**

Eine Keimung der Sporangien ist im gesamten untersuchten Temperaturbereich von 3 bis 28°C möglich (Abbildung 7). Das Optimum für die Sporangienkeimung liegt im Bereich von 5 bis 12 °C. Eine signifikante Steigerung der Keimrate 48 h nach Inokulation, im Vergleich zu 24 h nach Inokulation, ist nur bei den niedrigen Temperaturstufe (3°C und 5°C) statistisch zu belegen. Eine Auszählung nach 48 h ist zudem ungünstig, da sich in diesem Zeitraum Fremderreger auf dem PDA stark vermehren können. Schließlich ist bei dem Versuch noch die insgesamt recht geringe Keimrate der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* zu bemerken. Eine Keimrate von 40% wird nicht überschritten.

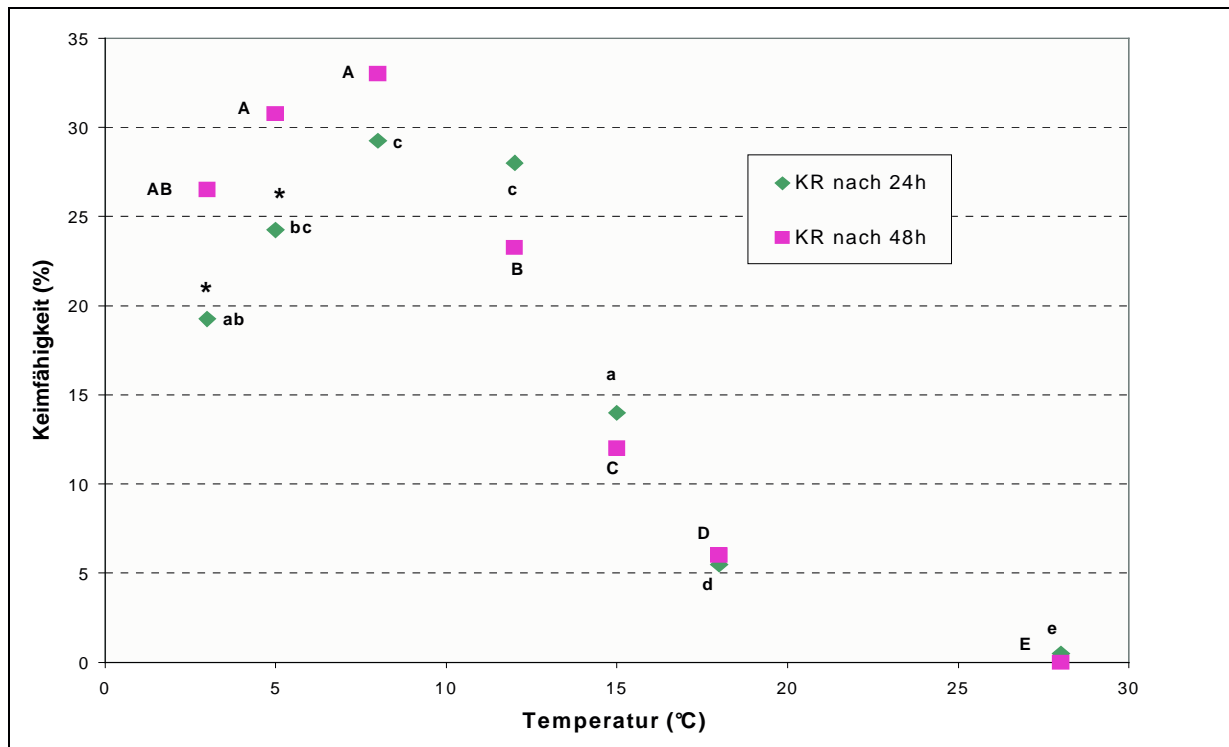


Abbildung 7: Keimfähigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur; ( $\alpha=0,05$ ); \*: signifikanter Unterschied der Zeitstufen bei einer Temperaturstufe; Kleinbuchstaben: Unterschiede zwischen den Temperaturstufen nach 24h; Großbuchstaben: Unterschiede zwischen den Temperaturstufen nach 48h

#### 4.2.3.1.2. Keimung in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer

Die Keimrate in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer konnte über einen Zeitraum von 2 bis 24 Stunden ermittelt werden (Abbildung 8). Mit den gewonnenen Daten wurde eine Breakpoint-Regressionsanalyse durchgeführt, die folgende Regressionsgleichung für alle Temperaturstufen ermittelt:

$$y = \begin{cases} a + b \cdot x & \text{wenn } x < \text{BP} \\ a + b \cdot \text{BP} & \text{wenn } x \geq \text{BP} \end{cases}$$

x: Blattnässedauer

y: Keimfähigkeit

a, b und BP (breakpoint): Regressionsparameter

Die Werte der einzelnen Regressionsparameter sind in Tabelle 10 dargestellt.

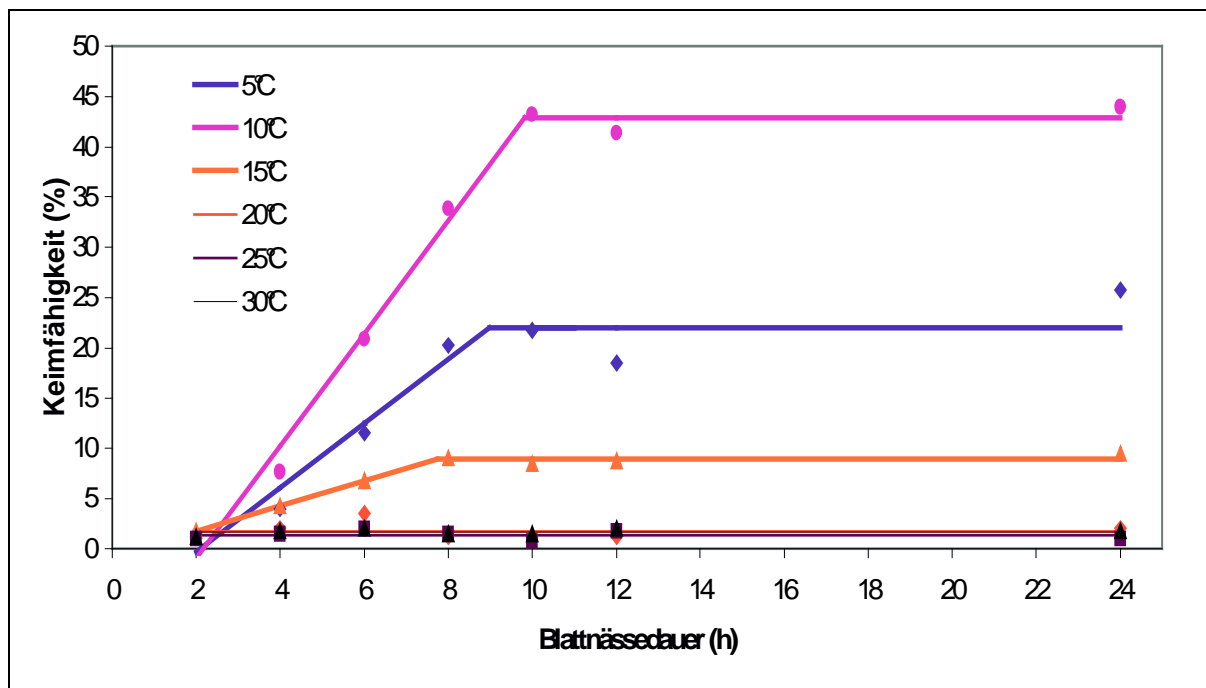
Zunächst bestätigt sich, daß eine Keimung prinzipiell über den ganzen untersuchten Temperaturbereich, also zwischen 5 und 30°C, möglich ist. Eine geringe Keimrate ist schon zwei Stunden nach Inokulation zu verzeichnen. Wieder wird der Temperatureinfluß auf die Keimung ersichtlich: bei ca. 10°C ist das Optimum anzusetzen. Als Temperaturbereich für

eine gute Keimung läßt sich 5 bis 15°C angeben. Bei höheren Temperaturen wird eine gleichbleibend geringe Keimrate (ca. 2-3 %) ersichtlich. Auch die Blattnässedauer hat einen Einfluß auf die Keimfähigkeit, allerdings nur bei den Temperaturstufen 5, 10 und 15°C (Abbildung 8). Bei der 10°C Variante ist höchste Keimfähigkeit zu verzeichnen, was sich im Anstieg der Regressionsgleichung ( $b=5,6$ ; s. Tabelle 10) widerspiegelt. Auch der Breakpoint (hier der Punkt ab dem kein Einfluß der Blattnässedauer auf die Keimfähigkeit genommen wird) liegt mit 10 Stunden später als bei den 5°C und 15°C Varianten (BP: 9,83 und 8,98). Bei 20°C, 25°C und 30°C ist kein Zusammenhang zwischen der Keimfähigkeit (%) und der Blattnässedauer festzustellen.

**Tabelle 10: Parameterschätzung Breakpoint-Regressionsanalyse; Keimfähigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer**

	a	b	BP	R <sup>2</sup>		N
<b>T=5</b>	-6,62500	3,2	8,980392	52,8	*	28
<b>T=10</b>	-12,1250	5,6	9,832402	86,1	*	56
<b>T=15</b>	-0,750000	1,3	7,750000	36,0	*	28
<b>T=20</b>	-1,43886	1,3	2,465282	2,5		28
<b>T=25</b>	-4,43435	2,7	2,153417	2,7		28
<b>T=30</b>	-4,42829	2,8	2,176033	3,6		28

a, b, BP: Regressionsparameter; R<sup>2</sup>: Maß zur Beschreibung der Güte der Regressionsfunktionen an die gegebenen Meßwertpunkte; \*:  $p < 0,05$ ; N: Stichprobenumfang



**Abbildung 8: Breakpoint-Regressionsanalyse: Keimrate in Abhängigkeit von der Blattnässedauer und der Temperatur**

## 4.2.3.1.3. Infektion in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer

Zusätzlich wurde bei den Untersuchungen als Maß für die Infektion die befallene Blattfläche bestimmt. Auch hier wurde eine Breakpoint-Regressionsanalyse mit der folgenden Regressionsgleichung durchgeführt:

$$y = \begin{cases} a + b \cdot x & \text{wenn } x < \text{BP} \\ a + b \cdot \text{BP} & \text{wenn } x \geq \text{BP} \end{cases}$$

x: Blattnässedauer

y: befallene Blattfläche

Die Regressionsparameter a, b und BP (breakpoint) sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Der stärkste Befall (27 %) bildet sich bei einer Temperatur von 10°C (Abbildung 9). Auch bei Temperaturen von 5°C und 15°C kommt es noch zu einer Befallsstärke von etwa 7%. Auffällig ist dabei jedoch, daß die Befallsstärke der 5°C Variante nicht den Erwartungen, die die hohe Keimfähigkeit bei dieser Temperatur vermuten lassen, entspricht. Bei den höheren Temperaturvarianten von 20°C, 25°C, und 30°C kommt es, entsprechend der Keimfähigkeit, zu keiner oder nur zu einer sehr geringen Infektion (ca. 0 bis 2%). Auch ein Einfluß der Blattnässedauer wird bei diesen höheren Temperaturen nicht ersichtlich (s. Tabelle 11, Abbildung 9). Ebenso ist kein Einfluß bei der niedrigen Temperaturvariante von 5°C festzustellen. Die Blattnässedauer spielt nur bei Temperaturen zwischen 10 und 15°C eine Rolle, so ist nach 5 bis 7 Stunden bei 15°C der Breakpoint, also die maximale befallene Blattfläche erreicht. Bei der 10°C Variante kommt es erst nach einer Blattnässeperiode von 12 Stunden (s. breakpoint) zu einem maximalen Befall.

**Tabelle 11: Breakpoint-Regressionsanalyse: Befallene Blattfläche in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer**

	a	b	z	R <sup>2</sup>		N
<b>T=5</b>	0,844365	0,741073	7,099496	21,2		28
<b>T=10</b>	-2,87500	2,47750	11,99798	74,3	*	56
<b>T=15</b>	-3,71000	1,87750	5,38482	43,8	*	28
<b>T=20</b>	0,352879	0,274395	3,999973	5,1		28
<b>T=25</b>	-0,17874	0,08272	12,00001	9,1		28
<b>T=30</b>	0	0	0	0		28

a, b, BP: Regressionsparameter; R<sup>2</sup>: Maß zur Beschreibung der Güte der Regressionsfunktionen an die gegebenen Meßwertpunkte; \*: p<0,05; N: Stichprobenumfang

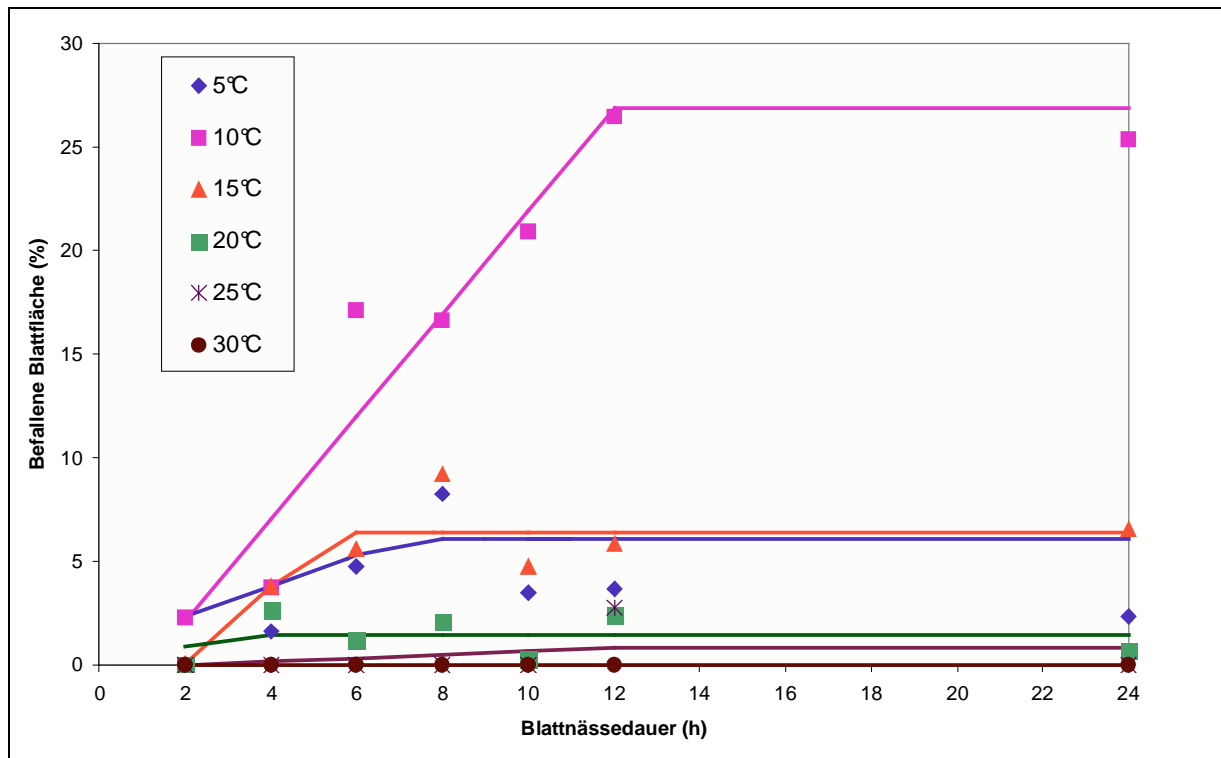
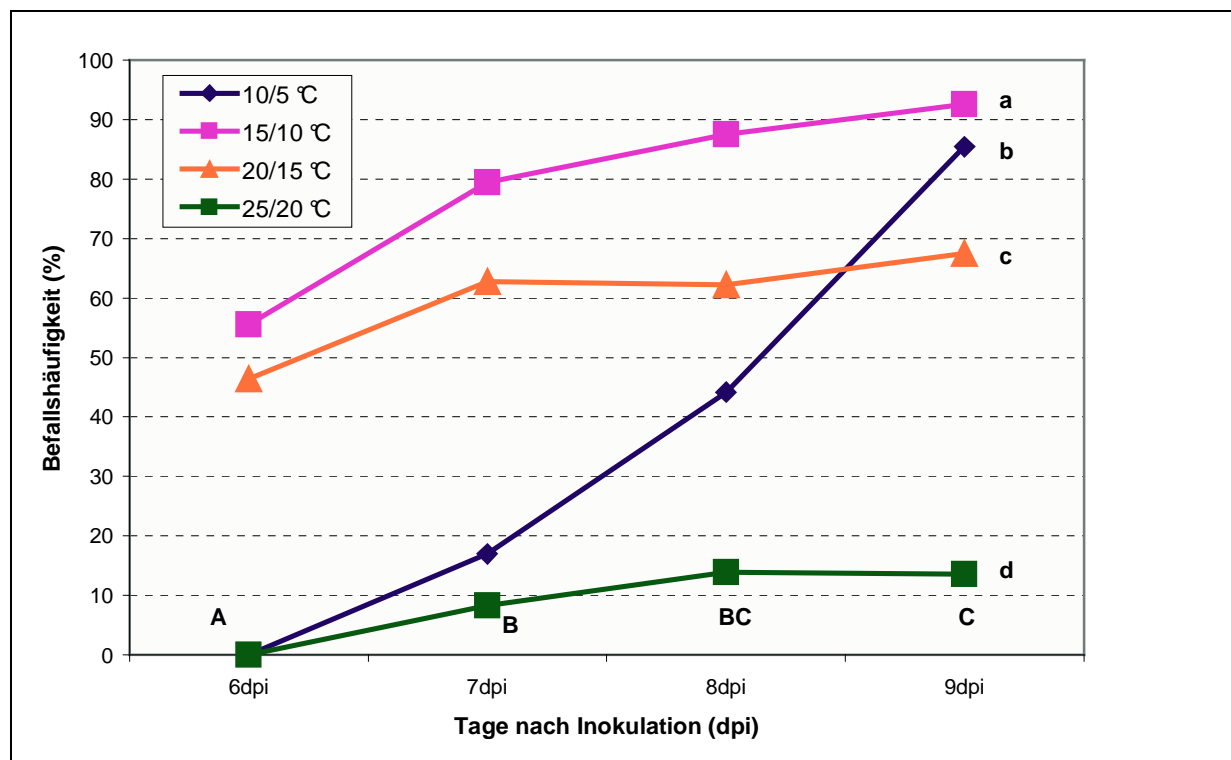


Abbildung 9: Breakpoint-Regressionsanalyse: Befallene Blattfläche (%) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer

#### 4.2.3.2. Dauer der Latenz

##### 4.2.3.2.1. Inkubations- und Latenzperiode in Abhängigkeit von der Temperatur

Zunächst wurde das Merkmal Befallshäufigkeit erfaßt um eine erste Aussage zur Entwicklungsgeschwindigkeit des Erregers zu erreichen (Abbildung 10). Die höchste Befallshäufigkeit wird bei der Temperaturstufe 15/10 °C erreicht (90%). Die geringste Befallshäufigkeit von ca. 13 % wird bei der hohen Temperaturstufe von 25/20 °C erzielt. Weiterhin stellt sich eine Entwicklung in der Befallshäufigkeit dar. Erst ca. drei Tage nachdem erste Symptome (als Blattaufhellungen) auftreten, kommt es zur maximalen Befallshäufigkeit (deutliche gelbe Blattflecken). Zu diesem Zeitpunkt können sich die ersten Befallsstellen schon in der Fruktifikationsphase befinden. Die Befallshäufigkeiten nach 6 dpi unterscheiden sich signifikant von denen nach 7, 8 und 9 dpi. Ein Erstbefall ist bei der niedrigen Temperaturvariante von 10/5 °C und der hohen Temperaturvariante (25/20°C) erst ca. einen Tag später (7 dpi) als bei den mittleren Temperaturvarianten (6 dpi) zu erkennen.

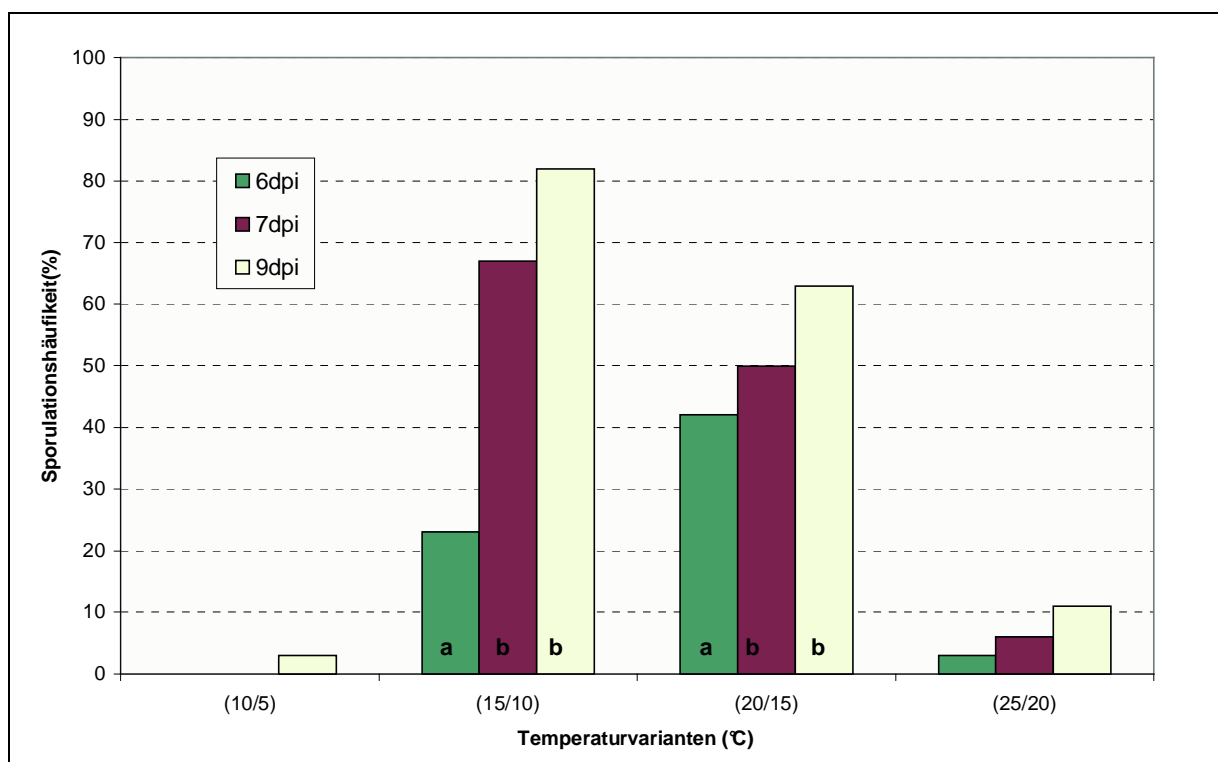


**Abbildung 10: Befallshäufigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur;  $10^5$  Sp./ml (LSD Test;  $\alpha=0,05$ ).**  
**Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten;**  
**Großbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Boniturterminen**

Für die epidemiologische Betrachtung des Pathogens ist aber nicht nur die Befallshäufigkeit von Bedeutung, sondern auch die Sporulationsintensität (s. Abbildung 11). Bei der

Auswertung wurde zur Wahrung der Normalverteilung auf die Werte der Varianten 10/5 °C und 25/20 °C verzichtet.

Die höchste Sporulationsintensität entsteht bei den Temperaturvarianten 15/10°C und 20/15°C. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Temperaturen läßt sich dabei nicht nachweisen. Ein signifikanter Unterschied in der Sporulationshäufigkeit dieser beiden Temperaturvarianten ist allerdings zu den Stufen 10/5°C und 25/20°C zu vermuten, obwohl dieses statistisch nicht untersucht werden konnte. Neun Tage nach Infektion kommt es bei der 15/10°C Variante bei über 80 % der befallenen Pflanzen zu einer Sporulation des Pathogens. Auffällig ist dagegen die sehr geringe Sporulationshäufigkeit des Pilzes von ca. 3 % der Pflanzen (9 dpi) bei der 10/5°C Variante. Bei dieser Temperaturkombination waren über 80 % der Pflanzen befallen. Bei sehr niedrigen Temperaturen kommt es zu einer hohen Befallshäufigkeit, aber nur zu einer sehr geringen Sporulationshäufigkeit. Zudem wird ein Einfluß des Faktors Zeit auf die Sporulationshäufigkeit ersichtlich (s. Abbildung 12). Die Sporulation nach 6 dpi unterscheidet sich signifikant innerhalb der Temperaturvarianten von der Häufigkeit nach 7 und 9 dpi.

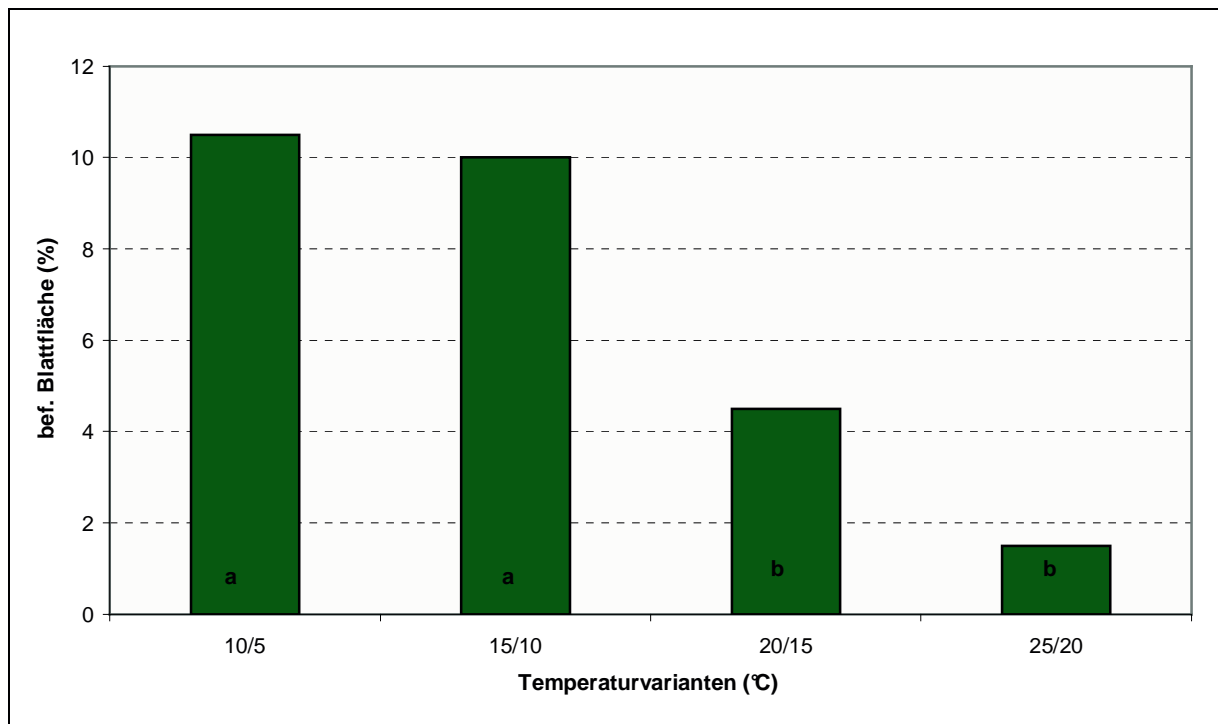


**Abbildung 11: Sporulationshäufigkeit (%) in Abhängigkeit von der Temperatur,  $10^5$  Sp./ml; ( $\alpha=0,05$ ; LSD-Test); Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Meßterminen einer Temperaturstufe**

Ein drittes wichtiges Merkmal bei der Bewertung ist die Befallsstärke (Abbildung 12). Bei den Temperaturvarianten 10/5°C und 15/10°C ist die Befallsstärke am höchsten (ca. 10%).



Die befallene Blattfläche bei diesen beiden Temperaturvarianten unterscheidet sich signifikant von den Befallsstärken bei den höheren Temperaturen (1,5 bis 4,5 %)



**Abbildung 12: Befallene Blattfläche (%) in Abh. v. d. Temperatur ( $\alpha=0,05$ ; LSD-Test); Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten**

#### 4.2.3.2.2. Latenzperiode in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke

In Abbildung 13 ist die Befallshäufigkeit nach 4, 6, und 10 dpi dargestellt. Die Befallshäufigkeit ist unabhängig von der Beleuchtungsstärke (keine signifikanten Unterschiede). Man erkennt weiterhin, daß schon nach vier Tagen erste Symptome auftreten, sogar eine geringfügige Sporulation ist auszumachen. Ein signifikanter Unterschied bei der Sporulationshäufigkeit zwischen den Beleuchtungsvarianten läßt sich nach vier Tagen nicht ausmachen. Nach sechs Tagen kommt es zu einer erheblichen Steigerung der Befalls- und Sporulationshäufigkeit. Bei Variante BS 3 liegt die Sporulationshäufigkeit nach sechs dpi signifikant höher als bei den Varianten BS 2 und BS 3. Nach 10 dpi zeigt sich jedoch, daß über alle Varianten eine 100%ige Befallshäufigkeit sowie auch eine 100%ige Sporulationshäufigkeit auszumachen ist.

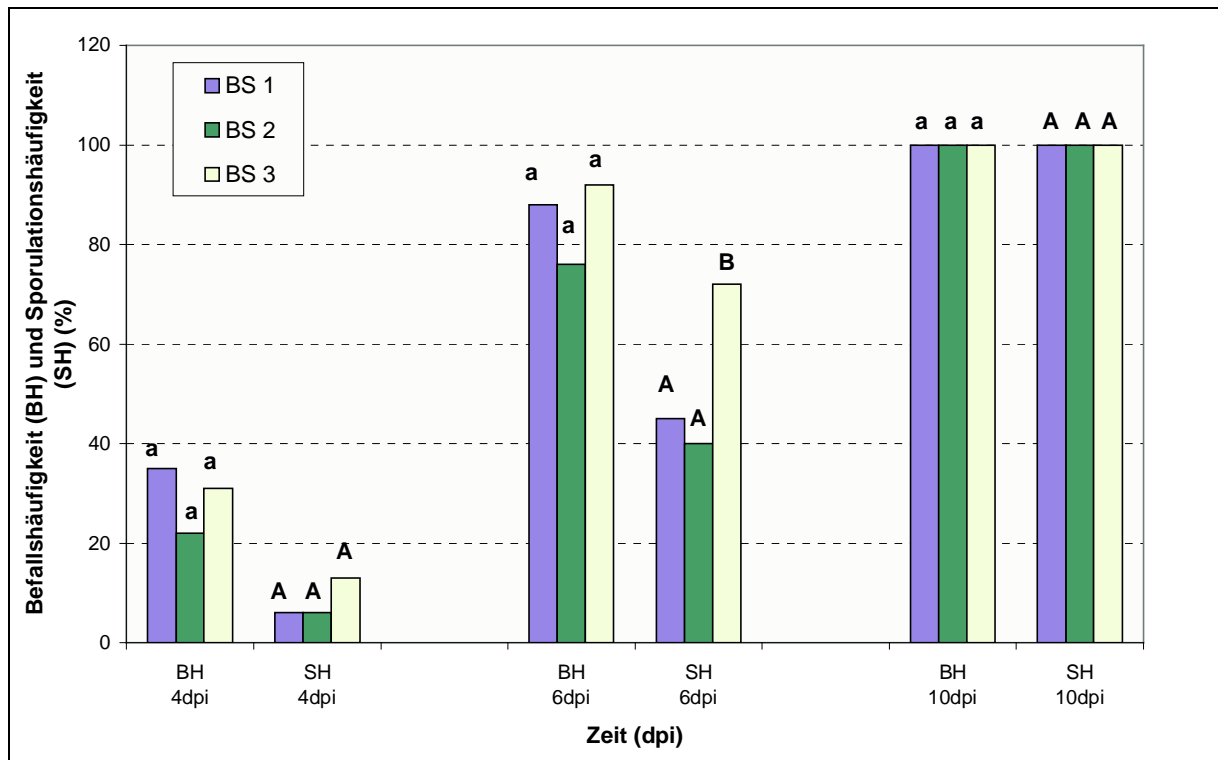


Abbildung 13: Befalls- und Sporulationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (LSD Test  $\alpha=0,05$ ); Temperatur 15/10°C. Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Befallshäufigkeiten; Großbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Sporulationshäufigkeiten

Betrachtet man die tatsächlich befallene Blattfläche nach 10 dpi (s. Abbildung 14), zeigt sich, daß der größte Anteil befallener Blattfläche bei den Varianten BS 2 und BS 1 auftritt. Bei der Variante BS3 ist die befallene Blattfläche signifikant geringer.

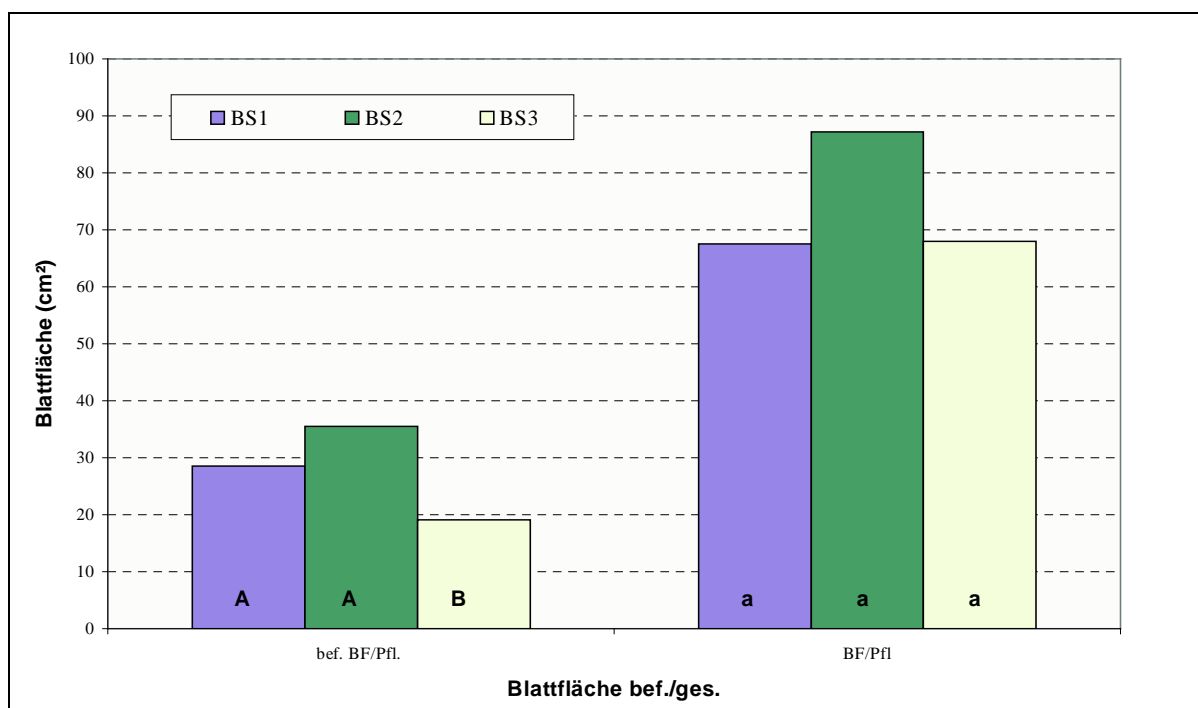


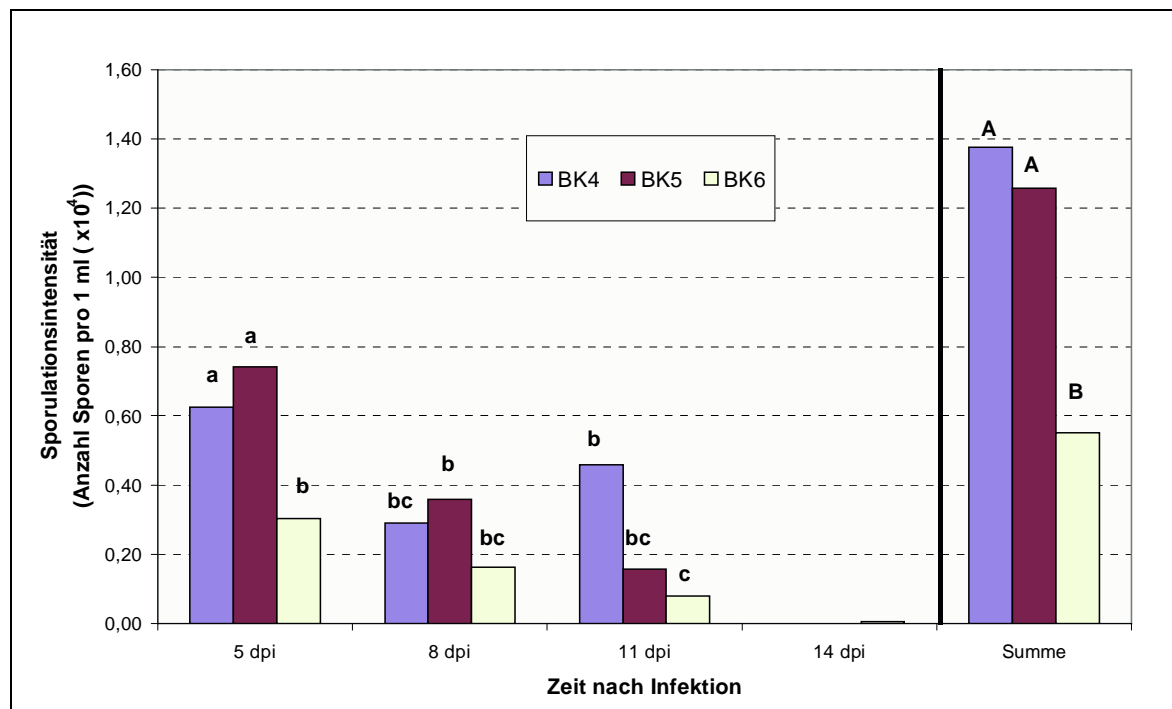
Abbildung 14: Befallene Blattfläche (cm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (10dpi) (LSD Test;  $\alpha=0,05$ ). Kleinbuchstaben Signifikanzen zwischen den Beleuchtungsstufen

### 4.2.3.3. Sporulationsdauer und -intensität

#### 4.2.3.3.1. Sporulationsdauer und -intensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit

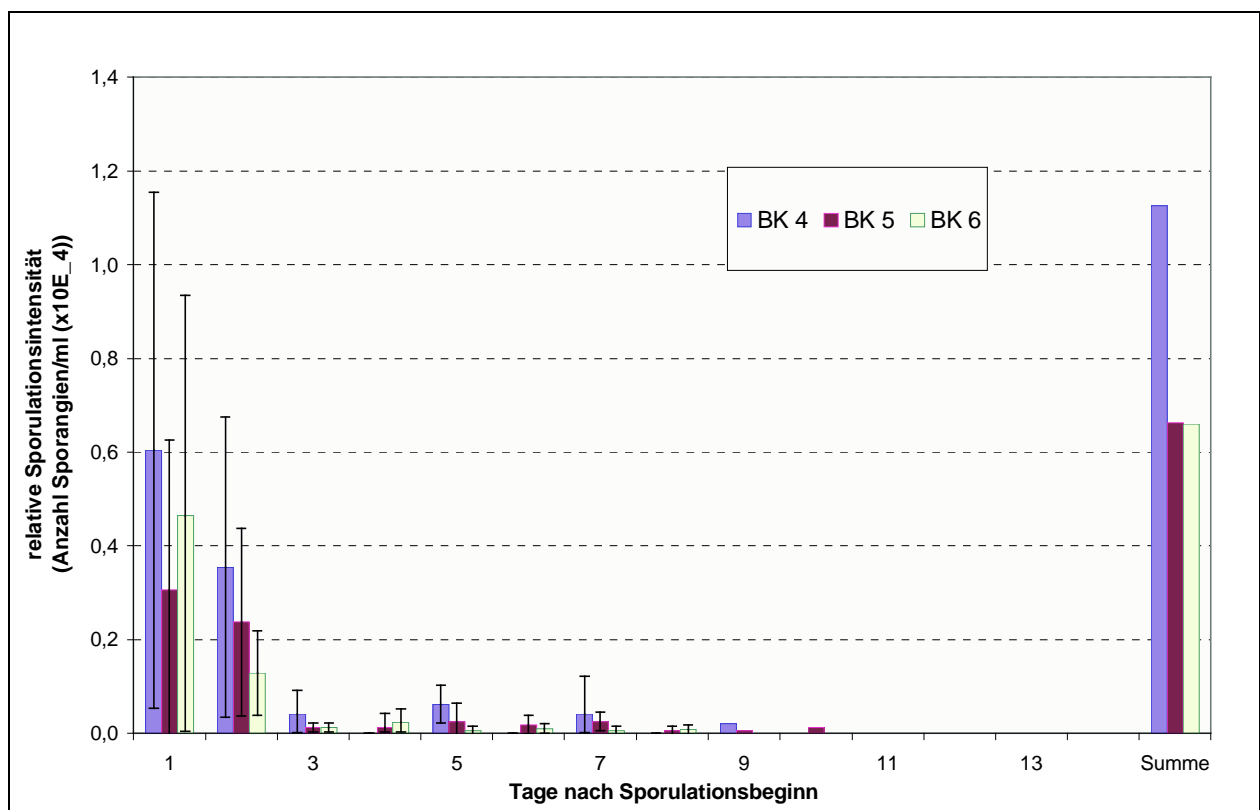
Neben Aussagen zur Latenz des Erregers ist für die Vorhersage einer Mehltau-epidemie eine Aussage zur Sporulationsintensität, die der Pilz während der Sporulationsphase aufweist, von Bedeutung. Gleichzeitig erhält man damit Angaben zur Länge der Sporulationsdauer unter den jeweiligen Bedingungen.

Zunächst wurde die absolute, von Läsionen unterschiedlicher Größe produzierte, Sporangienzahl ermittelt (nicht dargestellt). Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ergab sich hierbei summarisch bei der BK 6 eine Sporulationsintensität von  $17 \times 10^4$  Sporangien/1 ml dest. Wasser, bei der BK 5  $13 \times 10^4$  Sporangien/1ml aqua dest. und bei BK 4  $4 \times 10^4$  Sporangien/1ml aqua dest.. Diese Unterschiede in der Sporulationsintensität lassen sich zunächst durch die unterschiedlichen Befallsflächen erklären. Zum besseren Vergleich zwischen den Befallsklassen wurde jedoch die relative Flächenproduktivität gewählt, und die absoluten Werte entsprechend umgerechnet (s. Abbildung 15) (Umrechnung  $x = \text{Wert der Sporulationsintensität der Befallsklasse} / \text{Befallsfläche}$ ). Es zeigt sich, daß die Flächenproduktivität der BK 4 und 5 signifikant höher ist als bei der BK 6. Es kann festgehalten werden, daß die Sporulationsdauer unter den gewählten günstigen Bedingungen insgesamt 11 Tage beträgt.



**Abbildung 15:** Relative Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit; (Bezug 1%; LSD Test  $\alpha = 0,05$ ). Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Varianten zu den Meßterminen 5,8 und 11 dpi; Großbuchstaben: Signifikanzen der unterschiedliche Befallsstärken

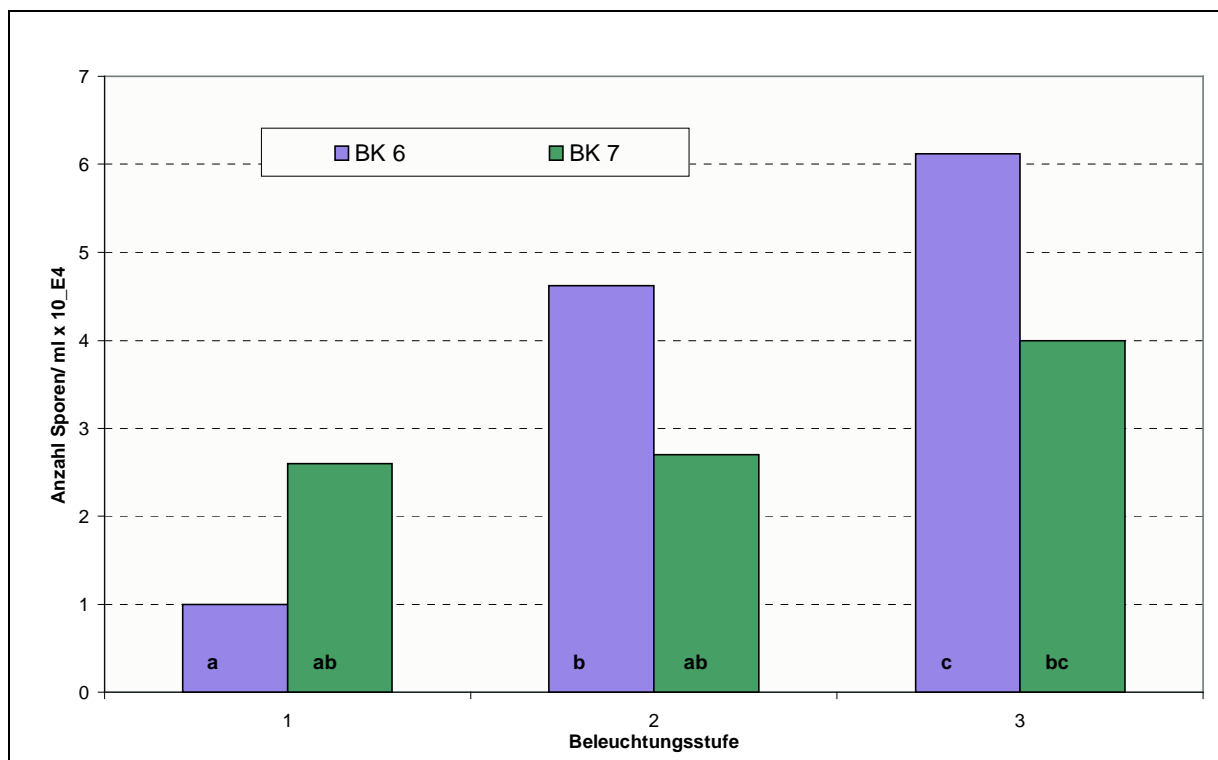
Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Entwicklung der Sporulationsintensität verhält, wenn jeden Tag günstige Bedingungen für die Sporulation (98% rel. Feuchte während der Dunkelphase) vorliegen. Für die ermittelten Daten wurde die relative Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Zeit und der Befallsstärke berechnet (Abbildung 16). Bei täglich günstigen Bedingungen für die Sporulation zeigt sich ca. zwei Tage nach Einsetzen der Sporulation eine Abnahme der Sporulationsintensität. Lag diese während der ersten zwei Tage nach Sporulationsbeginn zwischen 0,2 und 0,6 Sporangien pro 1 ml aqua dest., so lag sie am dritten Tag unter 0,1 Sporangien pro 1 ml aqua dest.. Die Sporulationsdauer betrug zehn Tage, wobei nach dieser Zeit noch vereinzelte Sporangien unter dem Mikroskop nachgewiesen werden konnten. Die Summe an Sporangien (je 1% befallene Blattfläche), die über die gesamte Sporulationsdauer gebildet wurde, bei BK 4  $1,16 \times 10^4$  und bei BK 5 und 6 ca.  $0,65 \times 10^4$ , befindet sich im Bereich der Sporulationsintensitäten, die erzielt wurden, wenn nur alle paar Tage günstige Bedingungen für die Sporulation vorlagen.



**Abbildung 16: Relative Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Zeit und der Befallsstärke (Bezug 1% bef. Blattfläche; täglich optimale Sporulationsbedingungen) Balken: Standardabweichung**

#### 4.2.3.3.2. Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Strahlung

Bei der Darstellung der Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Strahlung wurde die Sporulationsintensität jeweils auf eine befallene Blattfläche von 30% bezogen (Abbildung 17). Zunächst erkennt man eine signifikante Zunahme der Sporulationsintensität mit zunehmender Beleuchtungsstärke bei Läsionen der BK 6. Bei Läsionen der BK 7 hingegen erkennt man keine signifikante Steigerung der Sporulationsintensität. Die Befallsstellen der BK 7 bei den Varianten 1 und 2 unterscheiden sich signifikant von Befallsstellen der BK 6 der Beleuchtungsstufe 3.



**Abbildung 17: Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke ( $\alpha=0,05$ ; LSD Test; Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Varianten); Bezug 30% befallene Blattfläche**

#### 4.2.3.3.3. Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur

Ein weiteres Merkmal, das auf die Sporulationsintensität Einfluß nehmen kann, ist die Temperatur. In Abbildung 18 ist dieser Einfluß bei Temperaturen von 5, 10, 15 und 20 °C dargestellt bei einer Läsion der BK 6 (Bezug 1% befallene Blattfläche) dargestellt. Bei einer Sporulationstemperatur von 10°C kommt es nach 7 Tagen zu einer signifikant höheren Sporulationsintensität als bei Temperaturen von 5, 15 und 20°C. Signifikant gering ist die Sporulationsintensität bei einer höheren Temperatur von 20°C. Die Sporulationsintensitäten bei 5°C und 15°C unterscheiden sich nicht signifikant. Allerdings ist hierbei die Sporulationsdauer zu berücksichtigen. Sie beträgt bei 15°C 7 Tage, während sie bei 5°C >7

Tage beträgt. Bei 10°C beträgt die Sporulationsdauer ebenfalls >7 Tage, während sie bei 20°C mit 5 Tagen am geringsten ist.

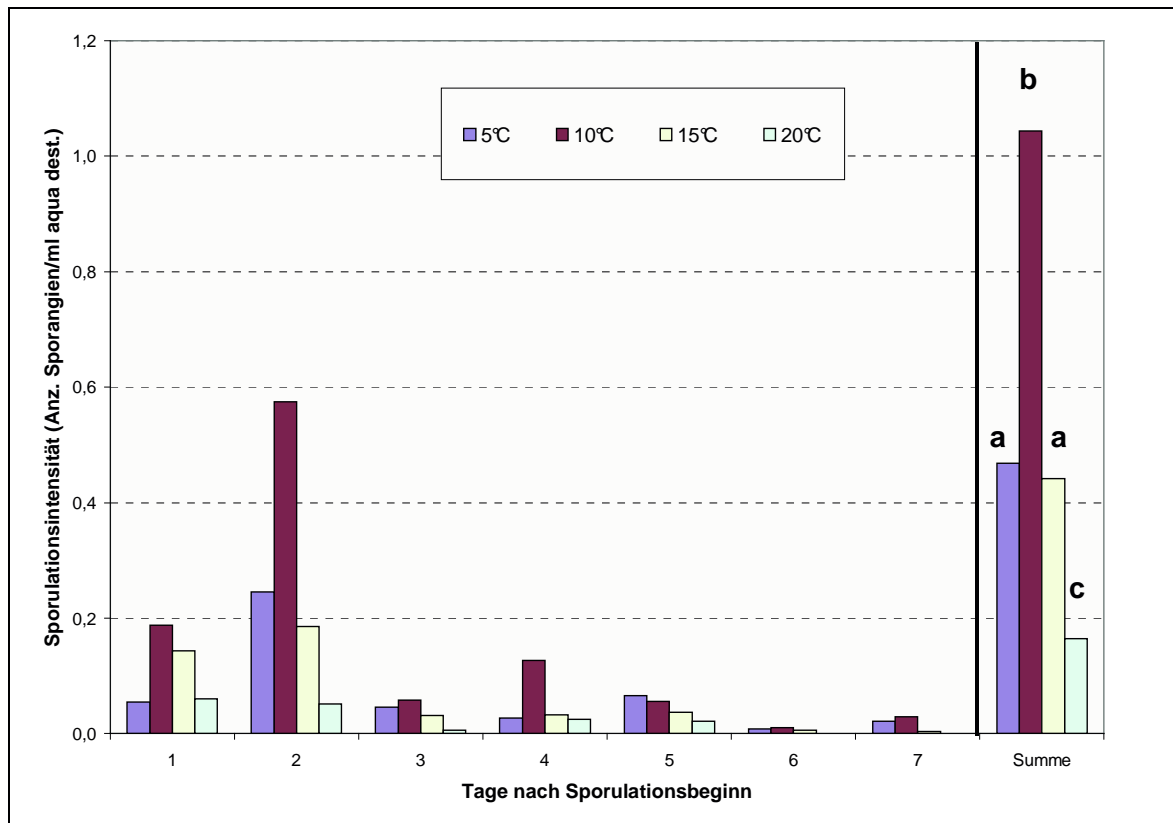


Abbildung 18: Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur (BK 6; Bezug 1%); LSD-Test;  $\alpha = 0,05$ . Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten

#### 4.2.3.4. Vitalität der Sporangien

##### 4.2.3.4.1. Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von der Temperatur

Bei der Untersuchung der Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von der Temperatur wurde zwischen Sporangien, die am Sporangienträger haften (Abbildung 19) und solchen, die abgelöst vom Sporangienträger sind, unterschieden (Abbildung 20).

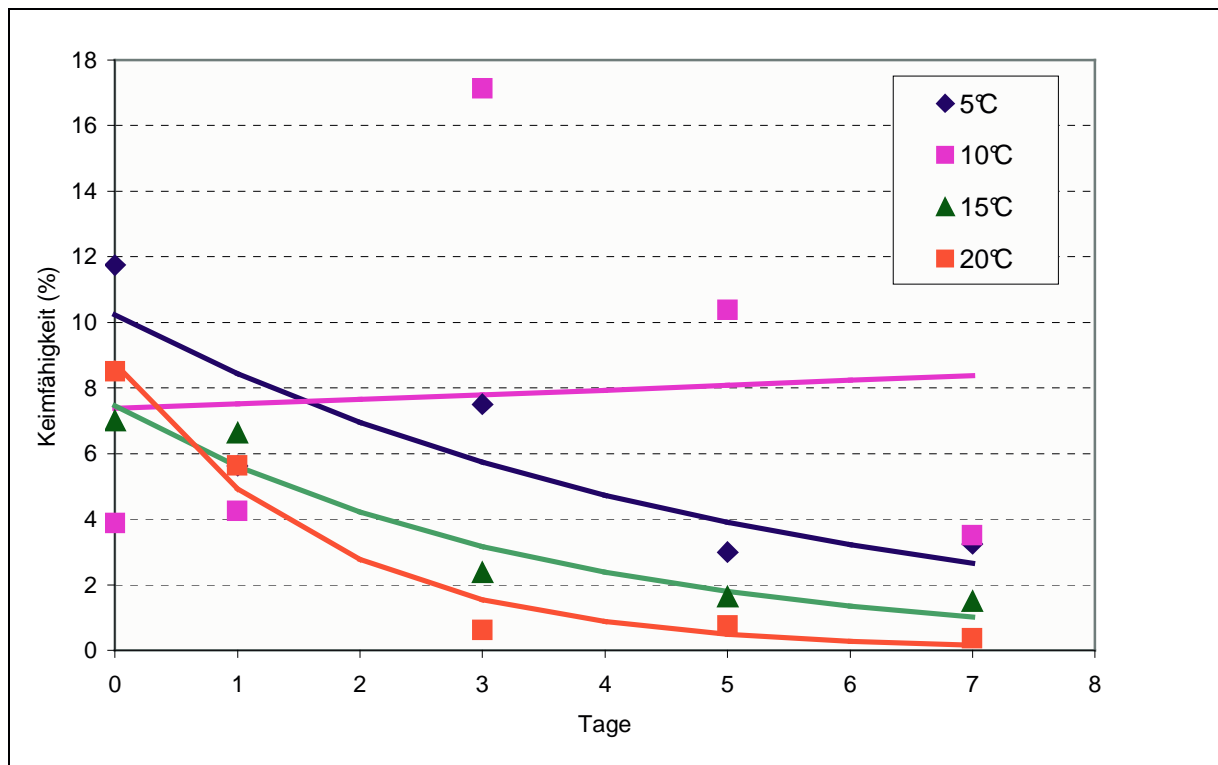
Mit den ermittelten Daten wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse mit der Regressionsgleichung: Keimrate (**KR**) =  $a \cdot \exp(-b \cdot \text{Zeit})$  durchgeführt. Die Parameter der Gleichung wurden für jede Temperaturvariante erfaßt und sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus jeweils 8 Messungen.

Bei den Temperaturstufen 5, 15 und 20°C kommt es bei allen Temperaturvarianten zu einer Abnahme der Keimfähigkeit der Sporangien mit zunehmender Zeit (Abbildung 19). Die Keimfähigkeit bei 20°C ist nach etwa 7 Tagen auf 0 abgesunken, während die Keimfähigkeit bei 5 und 15°C über den Untersuchungszeitraum hinaus auf einem geringen Niveau erhalten bleibt. Bei der 10°C Variante zeigt sich kein Einfluß der Temperatur auf die Keimfähigkeit der Sporangien über den Untersuchungszeitraum.

**Tabelle 12: Parameter der Regressionsgleichungen für die Abhängigkeit der Keimrate von der Temperatur. Regressionsgleichung:  $KR = a \cdot \exp(-b \cdot \text{Zeit})$ .**

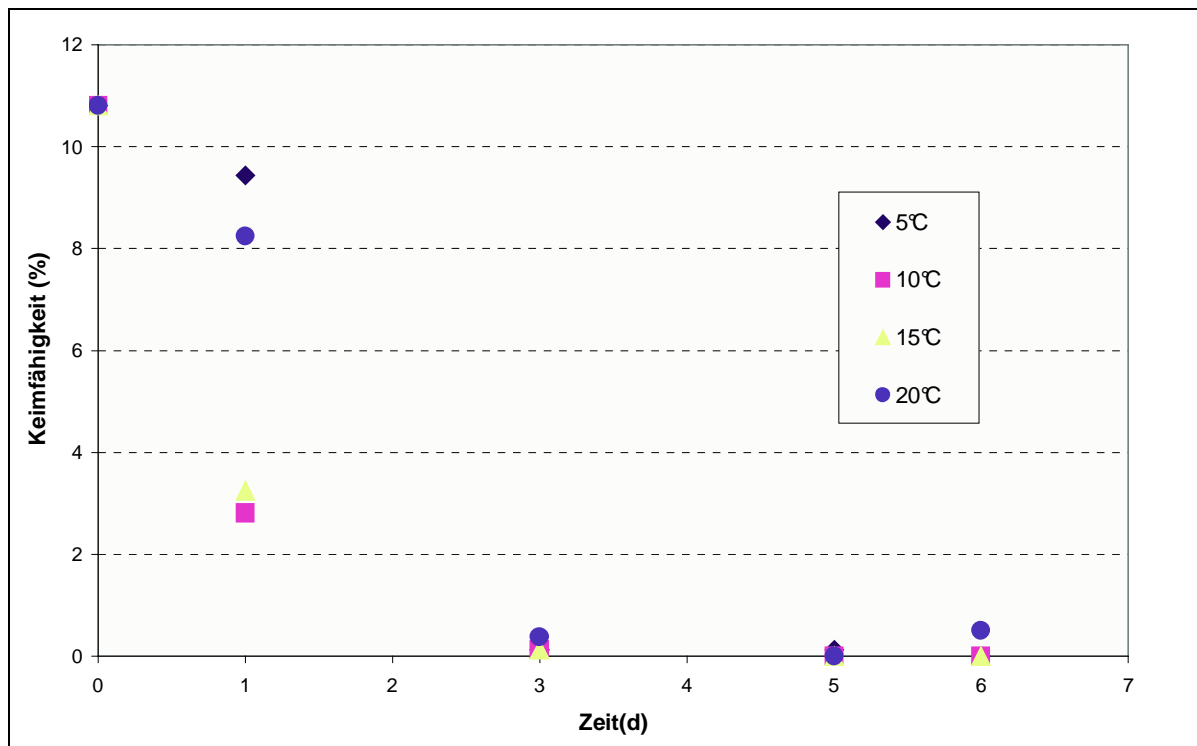
		Schtzg.	Standardfehler		R <sup>2</sup>		N
5	a	10,23	1,31*		28,2*		40
	b	0,19	0,06*				
10	a	7,38	1,78*		0,4		40
	b	-0,02	0,06				
15	a	7,45	0,72*		52,1*		40
	b	0,28	0,06*				
20	a	8,75	1,01*		55,6*		40
	b	0,58	0,16*				

\*p<0,05



**Abbildung 19: nichtlineare Regression: Vitalität der Sporangien am Sporangienträger in Abhängigkeit von der Temperatur**

Bei Sporangien, die vom Blatt abgelöst wurden, zeigt sich daß die Keimrate schon innerhalb eines Tages auf ein geringes Niveau zwischen 0,5 und 3% zurückgeht. Innerhalb von 3 Tagen ist die Keimfähigkeit unabhängig von der Temperatur auf 0 gesunken (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Vitalität der Sporangien abgelöst vom Sporangienträger in Abhängigkeit von der Temperatur (Keimfähigkeit (%))**

#### 4.2.3.4.2. Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von der Strahlung

Ein weiterer Klimafaktor, der die Vitalität der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* beeinflussen kann, ist die Intensität der Strahlung. In diesem Zusammenhang wurden zunächst Sporangien untersucht, die während der Untersuchungsphase am Sporangienträger hafteten. Mit den erhobenen Daten wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt (Abbildung 21). Die Regressionsgleichung lautet: Keimrate (**KR**)= $a \cdot \exp(-b \cdot \text{Zeit})$ , und die dabei geschätzten Parameter sind in Tabelle 13 dargestellt. Auch hier stellen die Meßpunkte Mittelwerte aus acht Messungen dar.

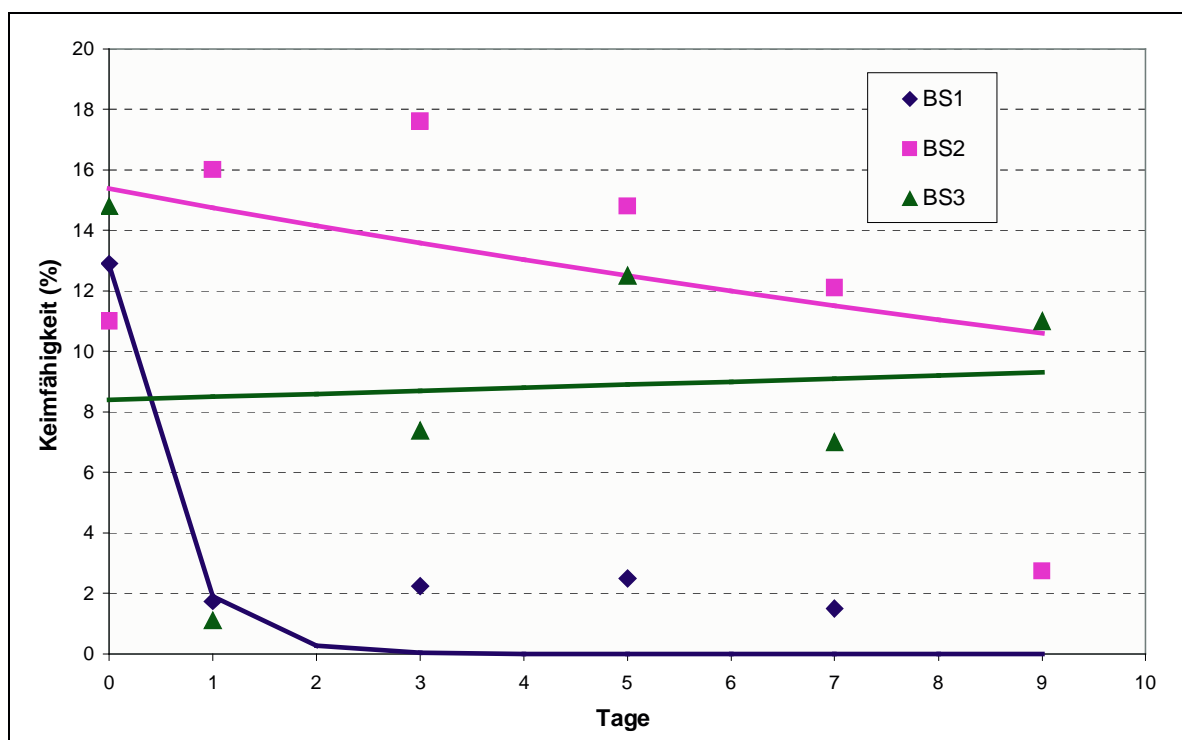
Bei der niedrigen Beleuchtungsstufe BS1 kommt es über einen Zeitraum von sieben Tagen zu einer Abnahme der Keimfähigkeit auf ca. 0%. Bei den Beleuchtungsstufen 2 und 3 ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vitalität der Sporangien während des Untersuchungszeitraumes und der Beleuchtungsstärke zu erkennen. Die Keimfähigkeit bleibt über den Untersuchungszeitraum erhalten.



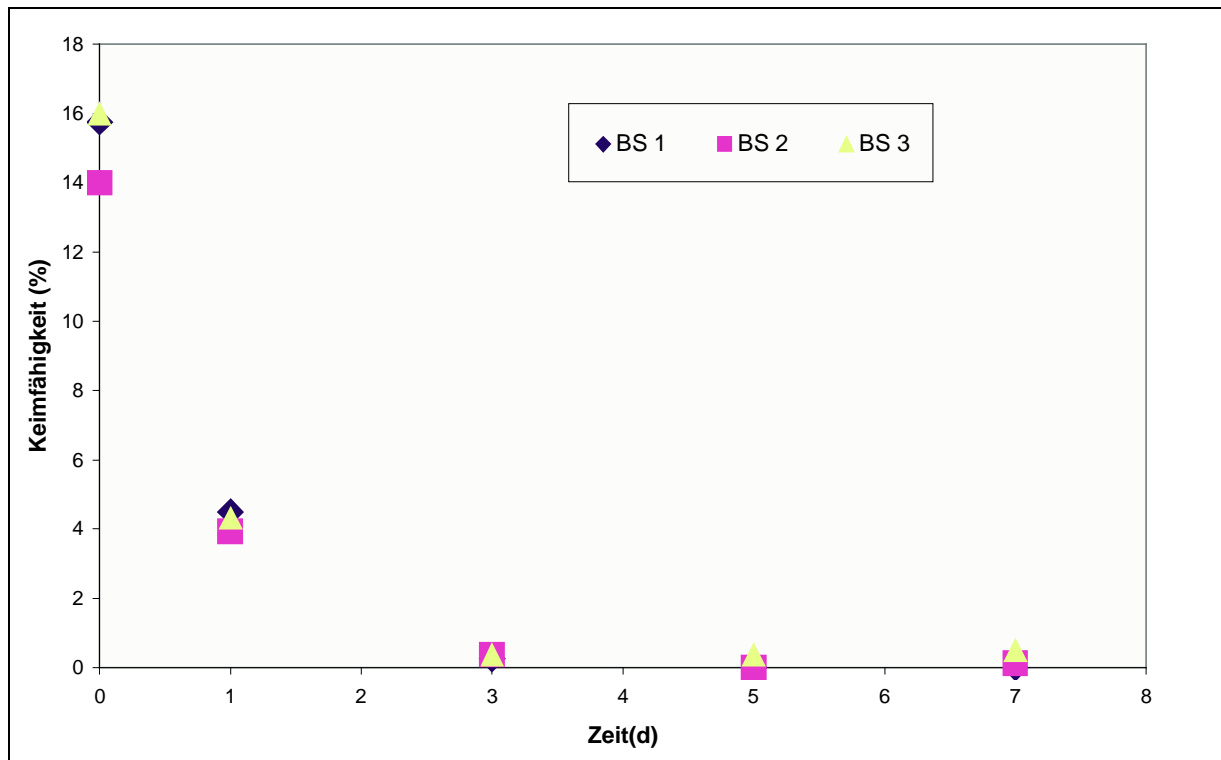
**Tabelle 13: Parameterschätzung nicht lineare Regression Keimfähigkeit abgelöst vom Blatt in Abhängigkeit von der Bestrahlung. Regressionsgleichung:  $KR = a \cdot \exp(-b \cdot \text{Zeit})$ .**

Bestrahlung	Parameter	Schtzg.	Standard		R <sup>2</sup>		N
BS1	a	12,9	1,03*		69,7	*	36
	b	1,9	0,54*				
BS2	a	15,5	1,43*		8,7		44
	b	0,05	0,02				
BS3	a	8,40	1,53*		0,2		44
	b	-0,01	0,04				

\*p<0,05



**Abbildung 21: nichtlineare Regression: Vitalität der am Blatt haftenden Sporangien in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke.**



**Abbildung 22: Vitalität der vom Blatt abgelösten Sporangien in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (Keimfähigkeit (%))**

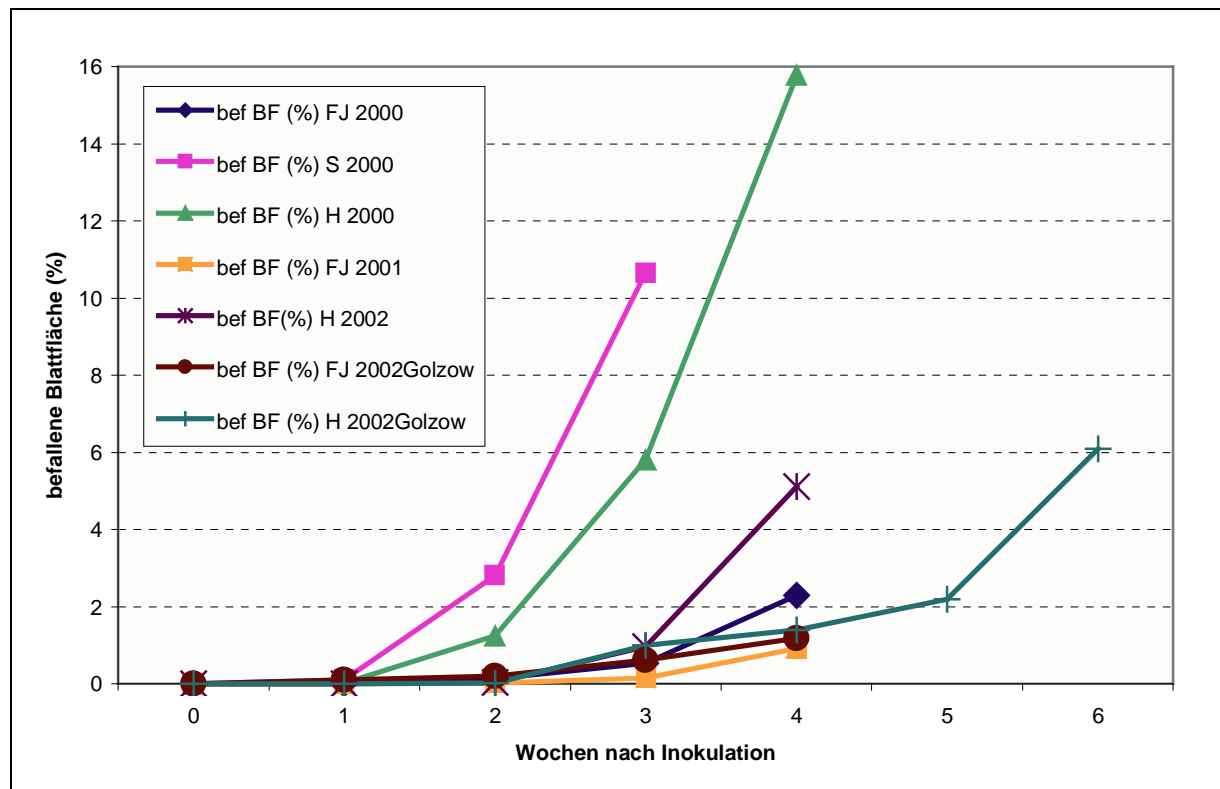
Die Keimfähigkeit der Sporangien, die vom Blatt abgelöst sind, sinkt unabhängig von der Strahlung rasch ab (s. Abbildung 22). Nach drei Tagen weisen die Sporangien aller Varianten eine Keimfähigkeit von 0% auf.

#### 4.2.4. Pathogenese unter Freilandbedingungen

##### 4.2.4.1. Freilandversuchsbonituren

###### 4.2.4.1.1. Befallsverläufe

Mit dem für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* entwickelten Boniturschema konnten über den Untersuchungszeitraum insgesamt sieben Befallsverläufe dokumentiert werden (Abbildung 23). Zwei Sätze (Frühjahr 2002 und Herbst 2002) konnten am Standort Golzow im Oderbruch erhoben werden.



**Abbildung 23: Befallsverläufe von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae***

Die dargestellten Befallsverläufe der sieben Sätze (Abbildung 23) lassen hinsichtlich des Befalls zu Kulturende tendenziell drei Gruppen erkennen: eine mit stärkerem (Sätze S2000, H2000), eine mit mittlerem (H2002, H2002 Golzow) und eine mit geringerem Befall (FJ2000, FJ2001, FJ2002 Golzow). Im Sommer und im Herbst 2000 konnten Befallswerte von 11 bis zu 16% erreicht werden. Diese Befallswerte liegen über dem maximal zulässigen Gelbanteil des Erntegutes von 6%, und die Sätze sind nach Kriterien der Verarbeitungsindustrie als Totalausfall zu werten. Bei den Sätzen FJ2000, FJ2001, FJ2002 Golzow lag der Befall bei 1 bis 2%. Befallswerte zwischen 5 und 6 % wurden bei den Sätzen H2002 und H2002 Golzow erreicht.

#### 4.2.4.1.2. Einflußfaktoren auf die Befallverläufe

Von den erfaßten Einflußvariablen konnten das Primärinokulum, die Sporulations- und Infektionshäufigkeit und die Kulturdauer als entscheidend für den Epidemiologieverlauf identifiziert werden.

##### Primärinokulum

Erfaßt wurde das Primärinokulum in den jeweiligen Spinatsätzen durch den Erstbefallswert (% befallene Blattfläche), der zum ersten Boniturtermin bestimmt wurde. Bei den sieben Sätzen kam es zu unterschiedlich starken Boniturwerten zur ersten Bonitur. Bei den Sätzen FJ2000, FJ2001 und FJ2002 kam es zu einem Erstbefallswert von  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ %. Bei den stärker befallenen Sätzen lagen die Erstbefallswerte im Bereich  $10^{-1}$ - $10^{-2}$ % (Tabelle 14). Die Höhe des Primärinokulums mag somit als ein Einflußfaktor auf die Entwicklung des Befallsverlaufs und den erreichten Endbefall zu werten sein. Zur Erklärung der unterschiedlichen Erstbefallswerte sind in Tabelle 15 die Tagesdurchschnittstemperaturen zur Inokulation im Bestand zusammengefaßt. Bei Sätzen mit einem höheren Erstbefallswert lag die Temperatur zur Inokulation bei 10 bis 15°C. Bei höheren Durchschnittstemperaturen kommt es zu Erstbefallswerten im Bereich  $10^{-3}$  %.

**Tabelle 14: Erstbefallswert (% befallene Blattfläche)**

	<b>Endbefall</b>	<b>Erstbefallswert (%bef. BF)</b>
<b>FJ2000</b>	schwach	0,004
<b>S2000</b>	stark	0,1
<b>H2000</b>	stark	0,02
<b>FJ2001</b>	schwach	0,001
<b>H2002</b>	mittel	0,1
<b>FJ2002Golzow</b>	schwach	0,06
<b>H2002Golzow</b>	(mittel)	0,007

**Tabelle 15: Tagesmitteltemperatur (°C) im Bestand zur Inokulation der untersuchten 7 Spinatsätze**

	<b>Erstbefallswert (% bef. BF)</b>	<b>Temperatur zur Infektion (Tagesmittel °C)</b>
<b>S2000</b>	0,1	15 (WS)
<b>H2000</b>	0,02	12
<b>H2002</b>	0,1	10
<b>H2002Golzow</b>	0,007	19
<b>FJ2000</b>	0,004	18
<b>FJ2001</b>	0,001	16
<b>FJ2002</b>	0,06	14

WS: Daten im Bestand nicht vorhanden, daher über Angaben der Wetterstation ermittelt (Temperatur in 2 m Höhe gemessen)

#### Sporulations- und Infektionshäufigkeit

Entscheidend für Sporulation und Infektion des Erregers ist die relative Feuchte im Bestand und hierbei insbesondere die relative Feuchte, die in der Nacht im Bestand herrscht. Eine hohe relative Feuchte von über 95% ist für Sporulations- und Infektionsereignisse bei Falschem Mehltau an Spinat notwendig. Die Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte größer 95% sind jeweils für drei Sätze mit schwachem Endbefall und starkem Endbefall in Abbildung 24 und Abbildung 25 mit der jeweiligen Tagesmitteltemperatur dargestellt.

Es wird dabei deutlich, daß bei den Sätzen mit einem schwachen Endbefall (Abbildung 24) die Anzahl Nächte mit einer hohen relativen Feuchte geringer ist (12 bis 18 Nächte), während bei Sätzen mit starkem Endbefall 18 (kürzere Kulturdauer) bis 23 Nächte erreicht werden. Auch die Anzahl an Folgenächten mit einer hohen relativen Feuchte ist bei den Sätzen mit schwachem Endbefall geringer (FJ2000: 9, FJ2001: 4, FJ2002Golzow: 11 Folgenächte) als bei Sätzen mit einem stärkeren Endbefall (S2000: 16 (kürzere Kulturdauer), H2000: 17, H2002: 12 Folgenächte). Die Tagesdurchschnittstemperaturen bei allen dargestellten Sätzen liegt zwischen 10°C und 20°C. Eine Ausnahme stellt der Satz H2002Golzow dar (Abbildung 25), hier lag die Tagesdurchschnittstemperatur im Bereich 10°C.

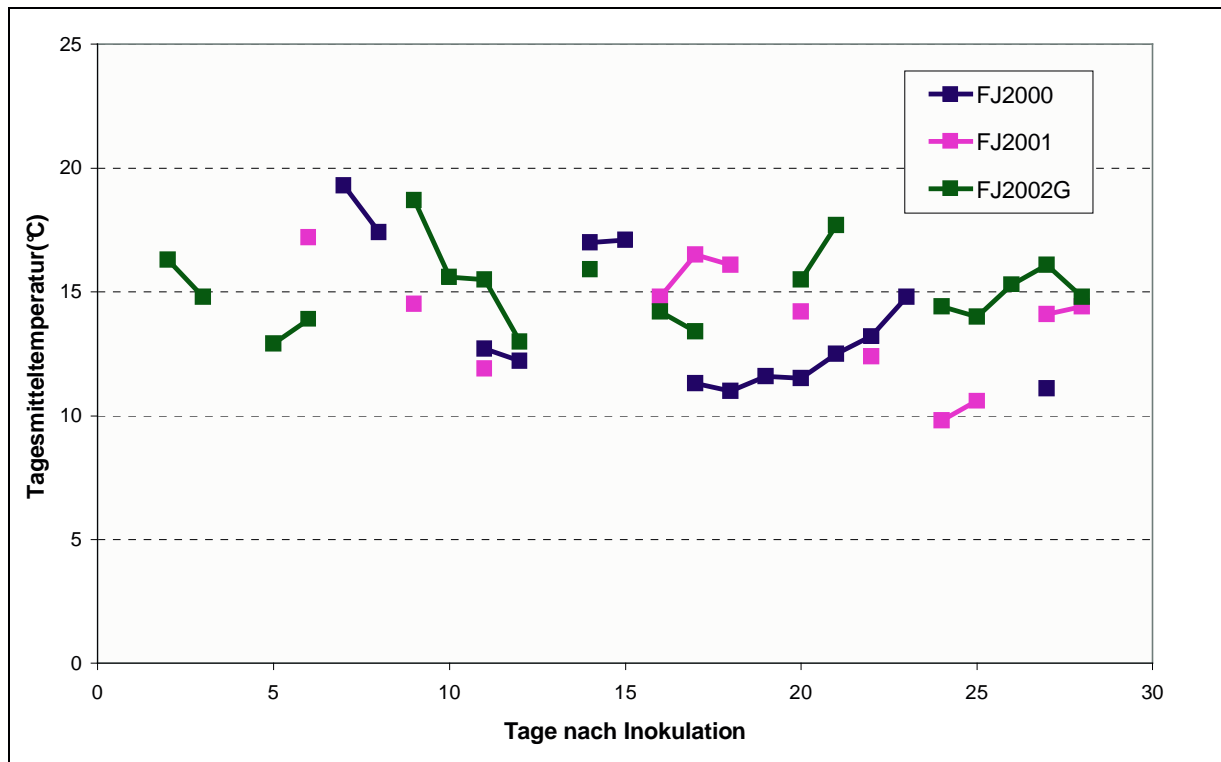


Abbildung 24: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (schwacher Endbefall)

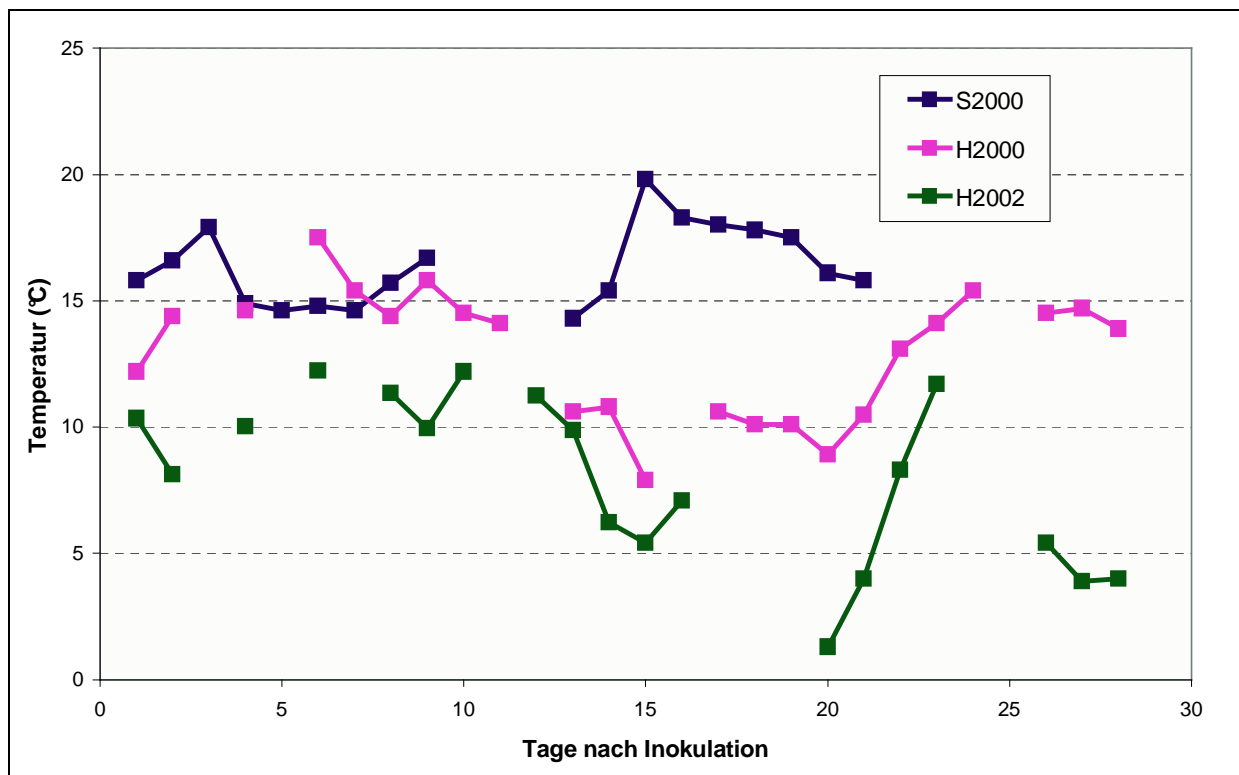
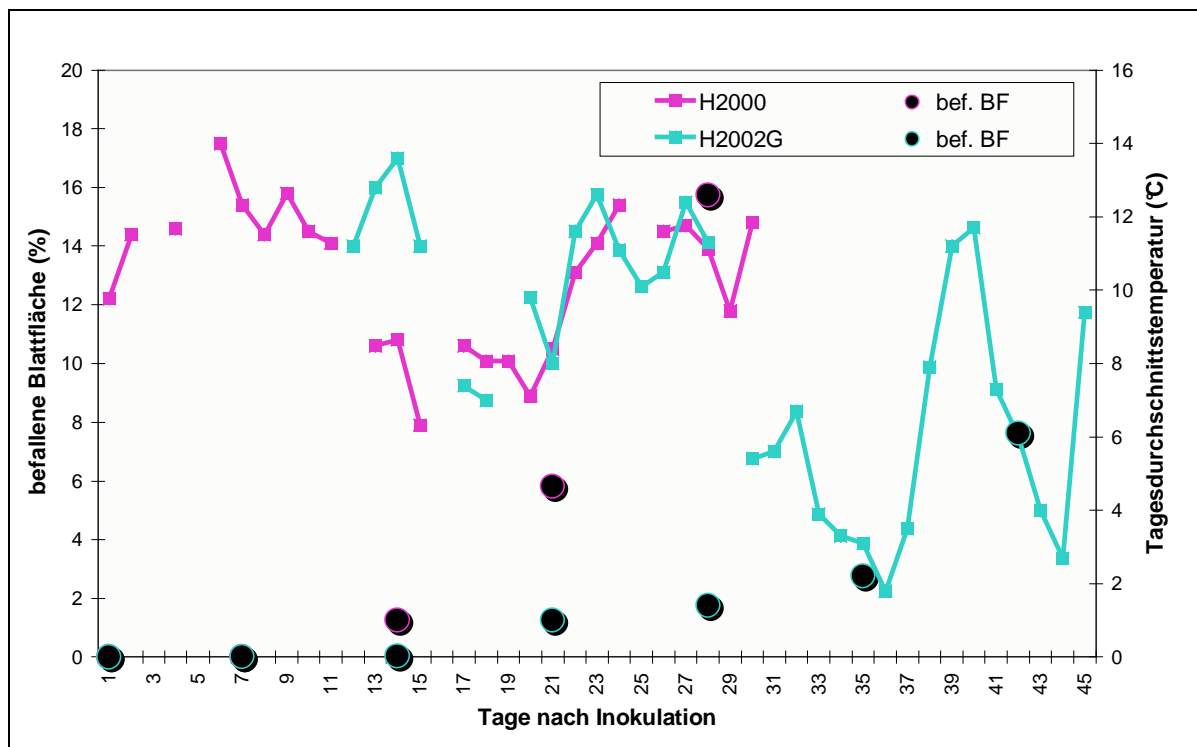


Abbildung 25: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (starker Endbefall)

Kulturdauer

Nach Inokulation der Spinatsätze erfolgte im Durchschnitt eine weitere Kulturdauer von ca. 30 Tagen, in denen vier Bonituren durchgeführt wurden. Eine zwei Wochen längere Kulturdauer erfolgte bei dem Satz H2002Golzow. Der Satz wurde für ca. 47 Tage nach der Inokulation weiterkultiviert, es konnten sechs Bonituren durchgeführt werden. Abbildung 26 zeigt den Satz H2002Golzow im Vergleich mit einem weiteren Satz mit starkem Endbefall (H2000), aber einer Kulturdauer von vier Wochen nach Inokulation. Vier Wochen nach Inokulation hat der Befall beim Satz H2000 16% erreicht, wohingegen beim Satz H2002G zu diesem Zeitpunkt lediglich ein Befall von ca. 2% erreicht wurde. Auch die Anzahl der Nächte mit einer relativen Feuchte größer 95% sind zu diesem Zeitpunkt geringer (15 Nächte) als beim Satz H2000 (25 Nächte). Erst 21 Tage nach Inokulation kommt es bei dem Satz H2002Golzow zu vielen Folgenächten mit einer erhöhten relativen Feuchte, dieses bedingt in den letzten zwei Wochen der Kultur eine Befallzunahme von 2% auf ca. 6%. Begünstigt wird der Befallsverlauf weiterhin durch die niedrigen Tagesmitteltemperaturen von etwa 8°C während dieser zwei Wochen. Während der ersten 14 Tage nach Inokulation treten bei diesem Satz keine Nächte mit erhöhter relativer Feuchte auf. Die längere Kulturdauer führt hier zu einem stärkeren Endbefall. Entscheidend ist dabei allerdings zu welchem Zeitpunkt der Kulturdauer die günstigen Sporulations- und Infektionsbedingungen auftreten.

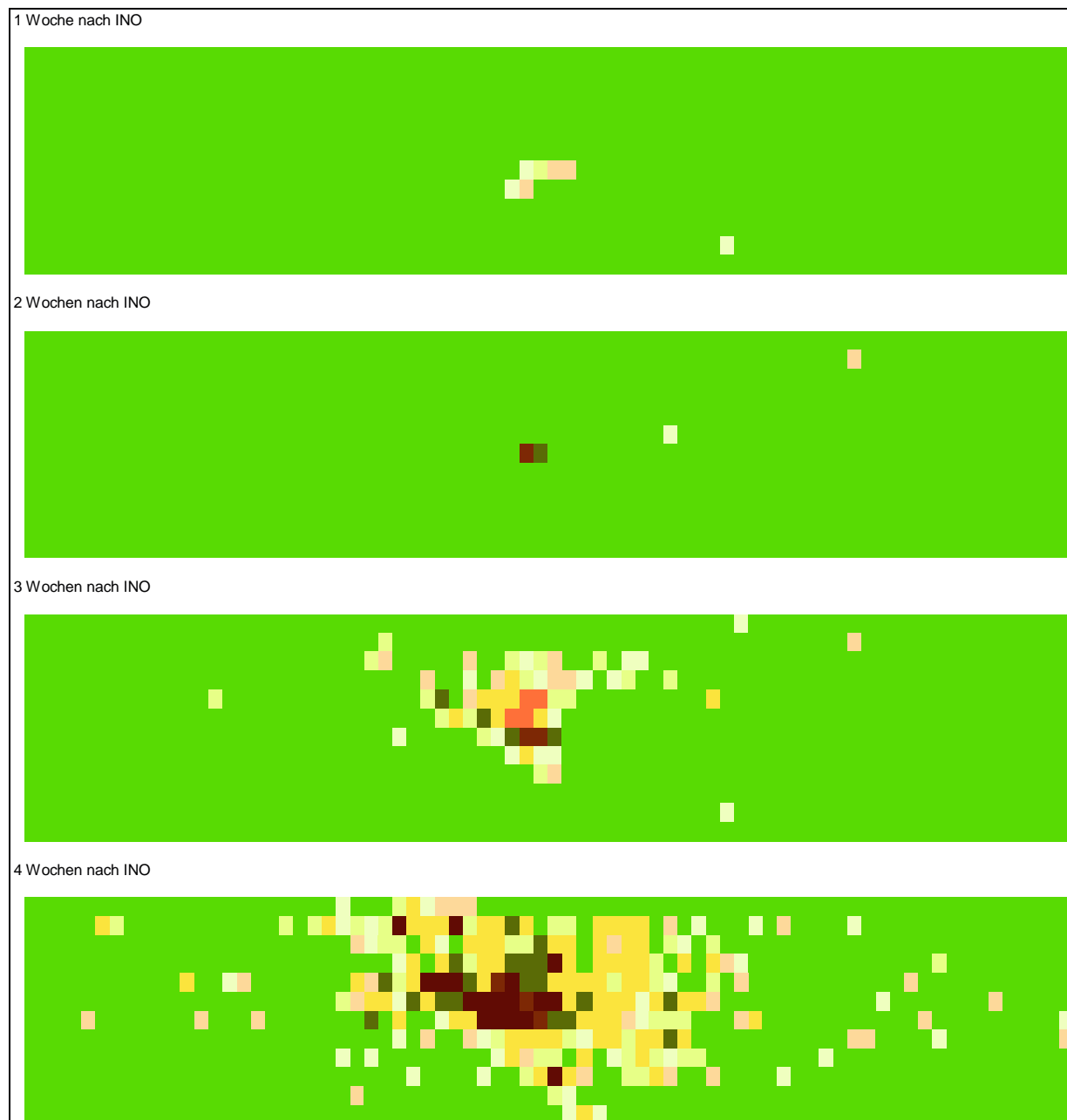


**Abbildung 26: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (unterschiedliche Kulturdauer)**

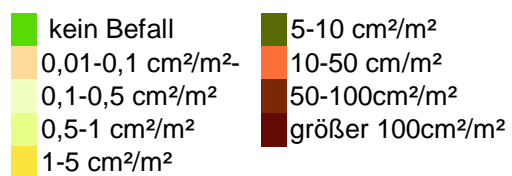
#### 4.2.4.1.3. Räumliche Ausbreitung

Da bei den Bonituren am IGZ im Freiland jeder Quadratmeter eines Bestandes bonitiert werden konnte, ist eine räumliche Darstellung der Entwicklung eines Befalls mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* im Bestand möglich (Abbildung 27, Abbildung 28). Für eine beispielhafte Darstellung wurden ein geringerer Befallsverlauf (FJ2000) und ein starker Befallsverlauf (H2000) ausgewählt. Beim Satz FJ2000 zeigt sich zunächst eine Woche nach Inokulation ein geringerer Erstbefallswert als bei dem Satz H2000. Bei dem Frühjahrssatz herrschten ungünstigere Bedingungen für den Erreger während der ersten zwei Wochen nach Inokulation, wie eine relative Feuchte nachts unter 95% (Abbildung 25). Zusätzlich zu dem geringen Erstbefallswert kann daher nur eine geringe Anzahl an Sekundärinfektionen zum zweiten Boniturtermin (zwei Wochen nach Inokulation) ausgemacht werden. Es kommt eher zu einer Ausdehnung des Befalls an den Pflanzen, die den ersten Befall an der Inokulationsstelle aufwiesen. Generell wird eine langsamere Entwicklung der Mehltau-epidemie ersichtlich, denn zwei Wochen nach Inokulation ist eine räumliche Ausdehnung im Bestand kaum zu erkennen. Bei dem dargestellten stark befallenen Herbstsatz (Abbildung 28) ist zunächst, wie schon beschrieben, der Erstbefallswert höher und die relative Feuchte im Bestand in den ersten zwei Wochen nach Inokulation für die Entwicklung des Erregers günstig. Daher kommt es schon nach zwei Wochen zu einer Vielzahl von Sekundärinfektionen. Die Entwicklung des Pathogens im Bestand verläuft deutlich schneller. Nach vier Wochen ist der gesamte Bestand zu einem hohen Grad gleichmäßig infiziert.

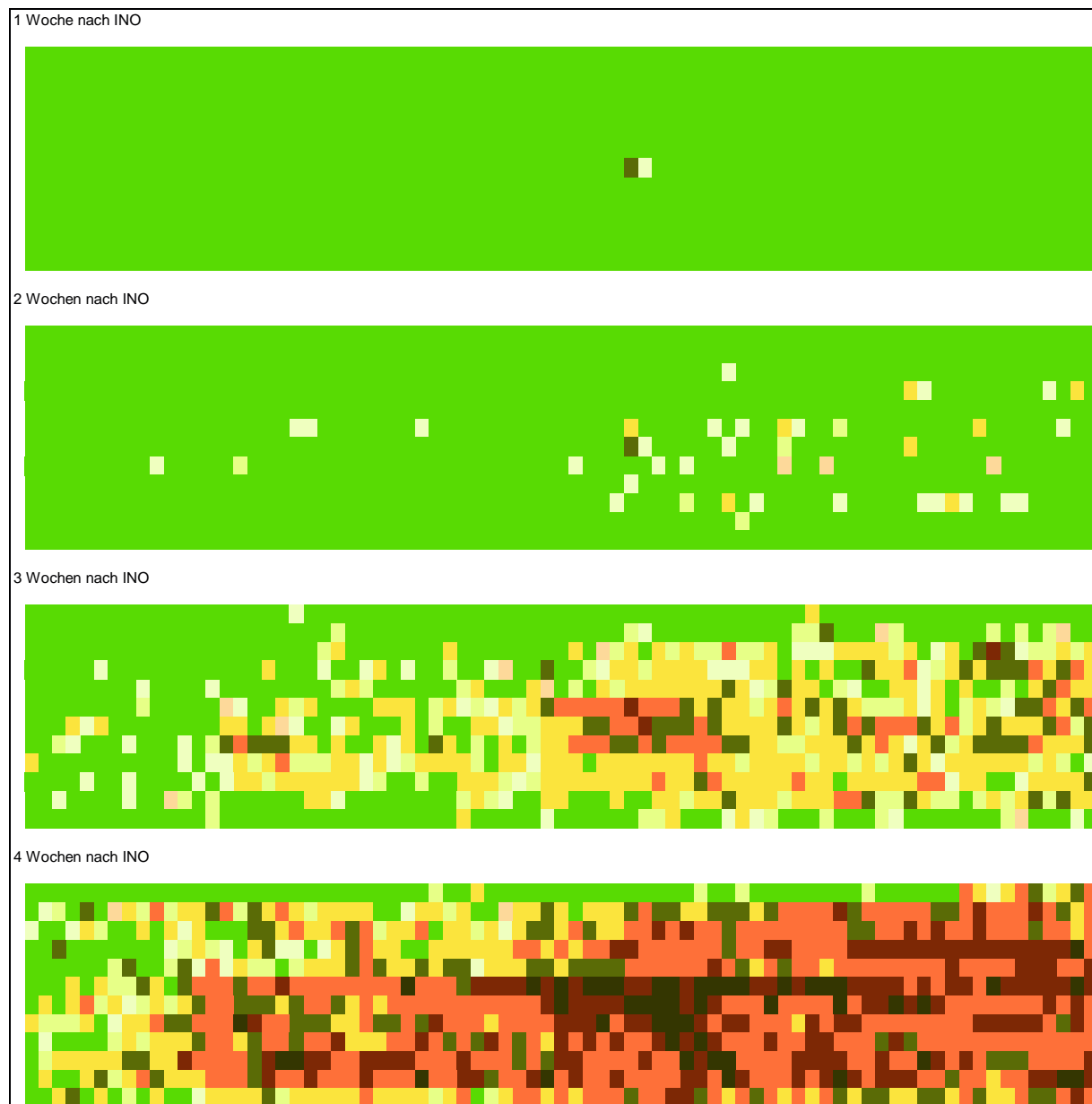




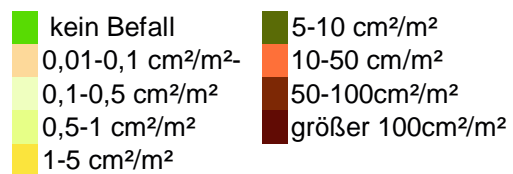
Oberflächenboniturwert:



**Abbildung 27: Räumliche Darstellung der Entwicklung von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* im Bestand; Frühjahr 2000 (Oberflächenboniturwert; 1-4 Wochen nach Inokulation)**



Oberflächenboniturwert:



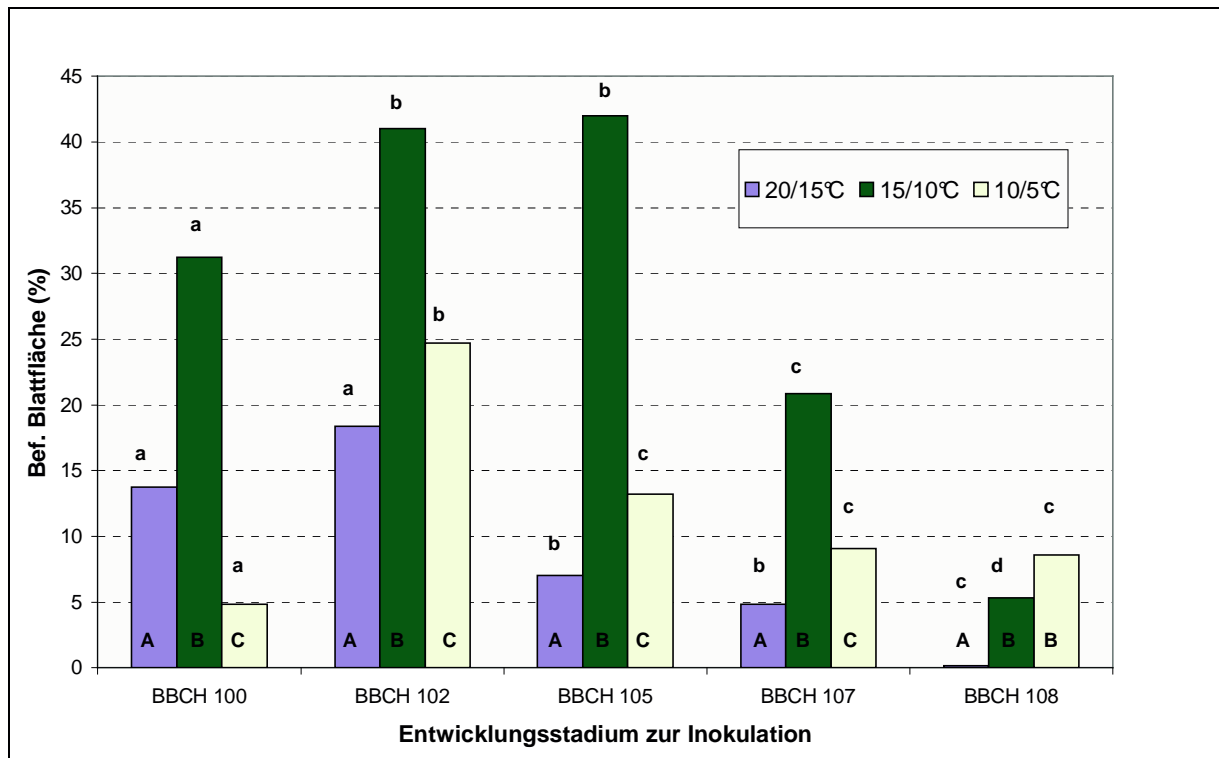
**Abbildung 28: Räumliche Darstellung der Entwicklung von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* im Bestand ; Herbst 2000 (Oberflächenboniturwert; 1-4 Wochen nach Inokulation)**

### 4.3. Wirt/Pathogen-Interaktion

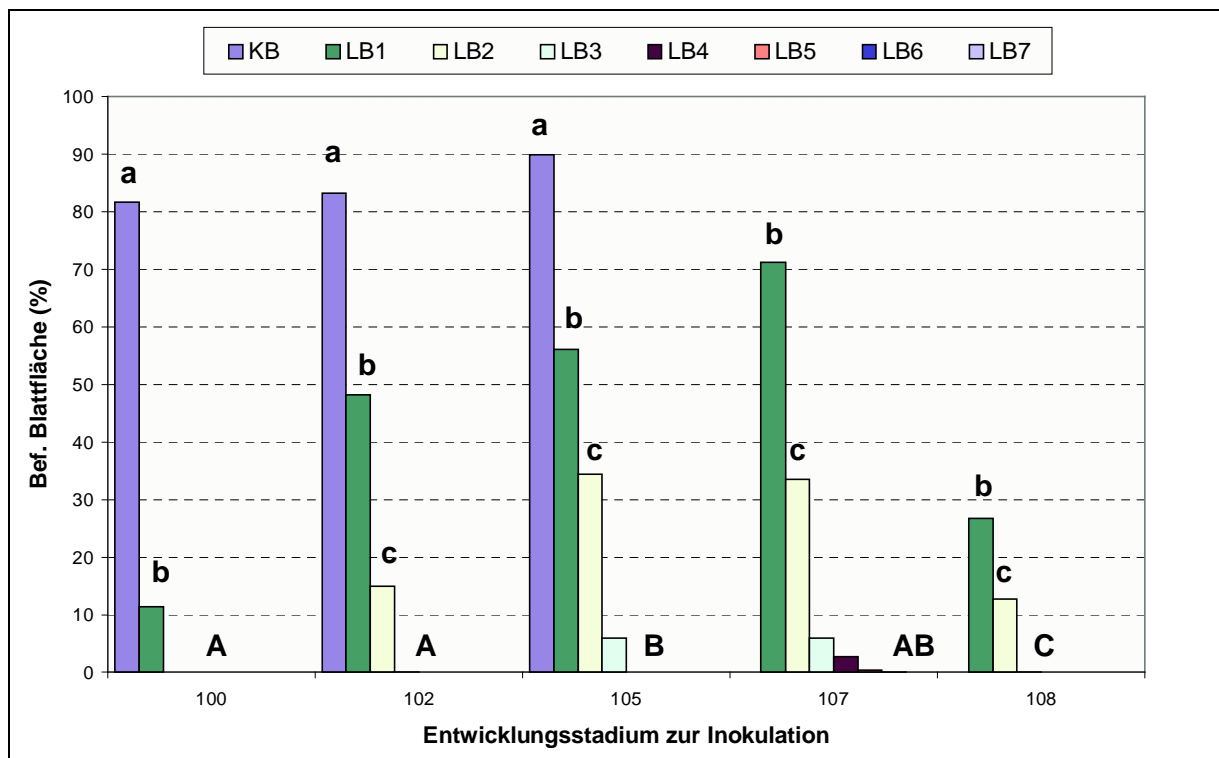
#### 4.3.1. Befall in Abhängigkeit vom Alter und Entwicklungsstadium

Bei der Untersuchung der befallenen Blattfläche, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Temperaturvarianten und Entwicklungsstadien der Spinatpflanze (Abbildung 29), ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Temperaturstufen in den einzelnen Entwicklungsstadien zu erkennen. Eine Ausnahme zeigt sich beim Entwicklungsstadium 108, hier ist kein Unterschied zwischen der 15/10°C Variante und der 20/15°C Variante auszumachen. In allen Entwicklungsstadien ist die befallene Blattfläche bei einer Temperatur von 15/10°C am höchsten. Die Maximalwerte für die befallene Blattfläche in diesem Versuch liegen bei der Temperaturvariante 15/10°C bei ca. 40%. Bei der Temperaturkombination von 20 und 15°C erhält man dagegen am wenigsten befallene Blattfläche. Die Maximalwerte liegen hier unter 20%. Befindet sich die Pflanze in den Entwicklungsstadien BBCH 102 und 105 so kommt es zur höchsten befallenen Blattfläche im Vergleich zu den anderen untersuchten Entwicklungsstadien (mit Ausnahme von: BBCH 100 bei 20/15 °C). Besonders ältere Entwicklungsstadien wie BBCH 107 und 108 zeigen geringere Befallswerte.

Eine Bewertung des Befalls der unterschiedlichen Blattpaare ist in Abbildung 30 für die Temperaturvariante 15/10°C dargestellt (s. Begriffbestimmung). Zudem wurden alle vorhandenen Blätter bewertet, so daß sich die Grafik bis Blattpaar LB7 fortsetzt, obwohl diese Blätter zum Zeitpunkt der Inokulation noch nicht vorhanden waren. Zu erkennen ist, daß die Keimblätter der Spinatpflanze am meisten Befall aufweisen (ca. 80-90 % befallene Blattfläche). Eine Aussage zu den Keimblättern der Entwicklungsstadien 107 und 108 ist allerdings nicht mehr möglich, da diese aufgrund der Seneszenz fehlen. Auch die Laubblattpaare LB1 und LB2 zeigen einen relativ starken Befall. Dieser steigt pro Blattpaar mit zunehmendem Entwicklungsstadium an, welches auch in Bezug zur unterschiedlichen Blattfläche der Blätter zum Inokulationszeitpunkt zu sehen ist. Insgesamt unterscheidet sich die befallene Blattfläche zwischen den Blattpaaren KB und LB1 bzw. LB2 signifikant. Die Pflanzen des ältesten untersuchten Entwicklungsstadiums (BBCH 108) zeigen den geringsten Befall und unterscheiden sich signifikant von allen anderen untersuchten Entwicklungsstadien. Hier ist die befallene Blattfläche bei allen Blattpaaren deutlich geringer, als aufgrund der vorhandenen Blattfläche anzunehmen wäre: bei Blattpaar LB1 liegt sie bei 28%, bei LB2 bei ca. 13%. Die inokulierten Blattpaare LB3 und LB4 zeigen zu diesem Entwicklungsstadium keinen Befall.



**Abbildung 29:** Befallene Blattfläche (%) in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Entwicklungsstadium (LSD-Test;  $\alpha = 0,05$ ). Großbuchstaben: Signifikanzen zwischen Temperaturvarianten innerhalb eines Entwicklungsstadiums; Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Entwicklungsstadien und innerhalb einer Temperaturstufe.

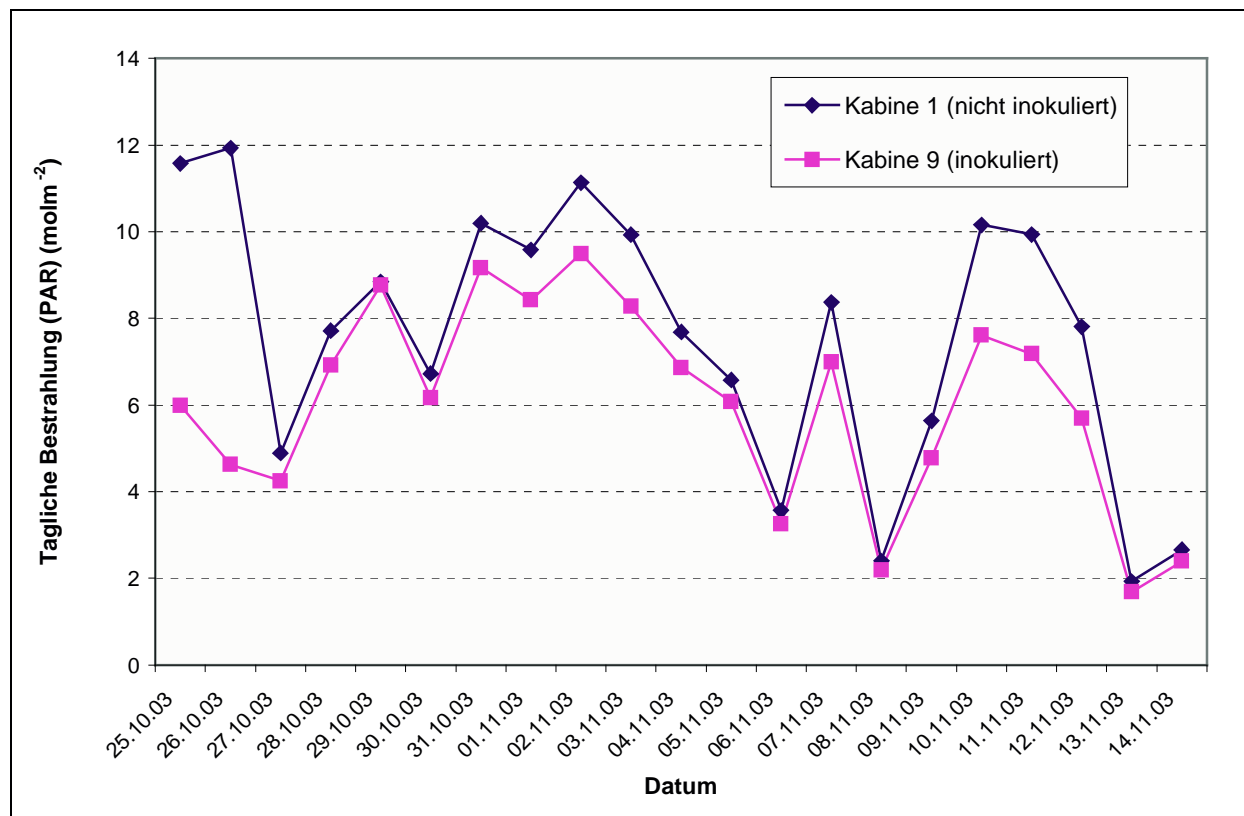


**Abbildung 30:** Befallene Blattfläche (%) pro entwickeltes Laubblattpaar in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (Temperaturvariante 15/10 °C).  $\alpha = 0,05$ , LSD Test. Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Blattpaaren KB-LB2; Großbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Entwicklungsstadien.

### 4.3.2. Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese

#### 4.3.2.1. Wachstumsparameter

Da der Versuch inokulierte und nicht inokulierte Pflanzen umfaßte, mußte er in zwei getrennten Gewächshauskabinen durchgeführt werden. Die in beiden Kabinen gemessene tägliche Bestrahlung ist in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Mittelwert der täglichen Bestrahlung (PAR) in den Anzuchtkabinen (mol/ m)**

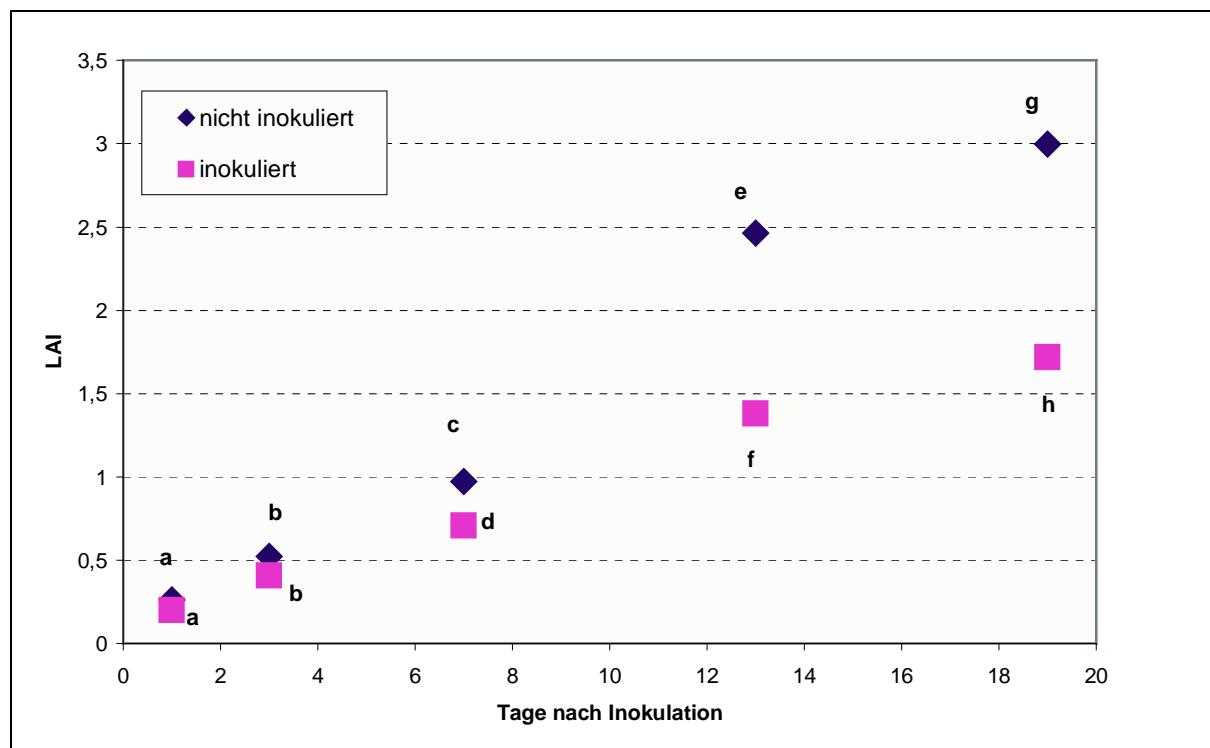
Daraus geht hervor, daß die Bestrahlung in der Kabine mit den nicht inokulierten Pflanzen etwas höher war als in der Kabine mit den inokulierten Pflanzen. Im Durchschnitt betrug dieser Unterschied bei 13%. Die größere Differenz an den beiden ersten Meßtagen (25.10. und 26.10.) ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Beschattung der Strahlungssensoren durch die Gewächshauskonstruktion bedingt.

Eine Bonitur der nach Inokulation erzielten befallenen Blattfläche (in % der Aussaatschale) wurde durchgeführt (Tabelle 16). Es wird bei der inokulierten Variante ein Befall von ca. 20 % befallene Blattfläche mit zu 100% befallenen Keimblättern erreicht. Bei dem letzten Untersuchungstermin nimmt die befallene Blattfläche wieder ab. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in diesem Zeitraum gesunde Blätter nachwachsen und stark befallene Blätter, wie die Keimblätter, abzusterben beginnen.

**Tabelle 16: Anteil der befallenen Blattfläche (%) in den untersuchten Aussaatschalen**

Saat- schale	Behandlung /Wiederholung	Tage nach Inokulation				
		1	3	7	13	19
<b>1</b>	<b>inokuliert 1</b>	0	0	Erste Blattauf- hellungen	Keimblätter: 100; Laubblätter: 25-30	Keimblätter: 100, beginnen zu faulen; Laubblätter 5-10
<b>2</b>	<b>nicht inokuliert 1</b>	0	0	0	0	0
<b>3</b>	<b>inokuliert 2</b>	0	0	Erste Blattauf- hellungen	Keimblätter: 100; Laubblätter: 20	Keimblätter: 100, beginnen zu faulen; Laubblätter: 15-20
<b>4</b>	<b>nicht inokuliert 2</b>	0	0	0	0	0
<b>5</b>	<b>inokuliert 3</b>	0	0	Erste Blattauf- hellungen	Keimblätter: 100; Laubblätter: ca.20	Keimblätter befallen, beginnen zu faulen; Laubblätter: 15
<b>6</b>	<b>nicht inokuliert 3</b>	0	0	0	0	0
<b>7</b>	<b>inokuliert 4</b>	0	0	Erste Blattauf- hellungen	Keimblätter: 100; Laubblätter: 15-20	Keimblätter befallen, beginnen zu faulen; Laubblätter: 15
<b>8</b>	<b>nicht inokuliert 4</b>	0	0	0	0	0

Zur Beurteilung des Wachstums dienten Messungen der Blattfläche, sowie der Frisch- und Trockenmasse. In Abbildung 32 ist der Zeitverlauf des Blattflächenindex dargestellt. Im Untersuchungszeitraum stieg der Blattflächenindex von 0,25 bei der nicht inokulierten Variante auf 3,0, und bei der inokulierten Variante auf 1,7 an. Die Blattfläche der inokulierten Variante entwickelt sich demnach langsamer als bei der nicht inokulierten Variante. Die Unterschiede in der Blattfläche zwischen den beiden Varianten nach 7, 13 und 19 Tagen sind signifikant. Auch die jeweiligen Blattflächen an den fünf Meßterminen unterscheiden sich signifikant voneinander.



**Abbildung 32: Entwicklung des Blattflächenindex (Mittelwert pro Schale). Kleinbuchstaben: Varianten unterscheiden sich signifikant; LSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ; krit. Wert Behandlung: 0,062.**

Auch bei der Entwicklung der Frischmasse zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht inokulierten und der inokulierten Variante (Abbildung 33). Bei der nicht inokulierten Variante steigt die Frischmasse von 40g auf 300g pro Schale an, während bei der inokulierten Variante ein Zuwachs von 40g auf 160g pro Schale erfolgt. Die geringe Frischmassezunahme zwischen dem 3. und 13. Tag nach Inokulation bei der inokulierten Variante fällt in den Hauptentwicklungszeitraum des Erregers vom 1. bis 13. Tag nach Inokulation (s. Befallsbewertung Tabelle 16).

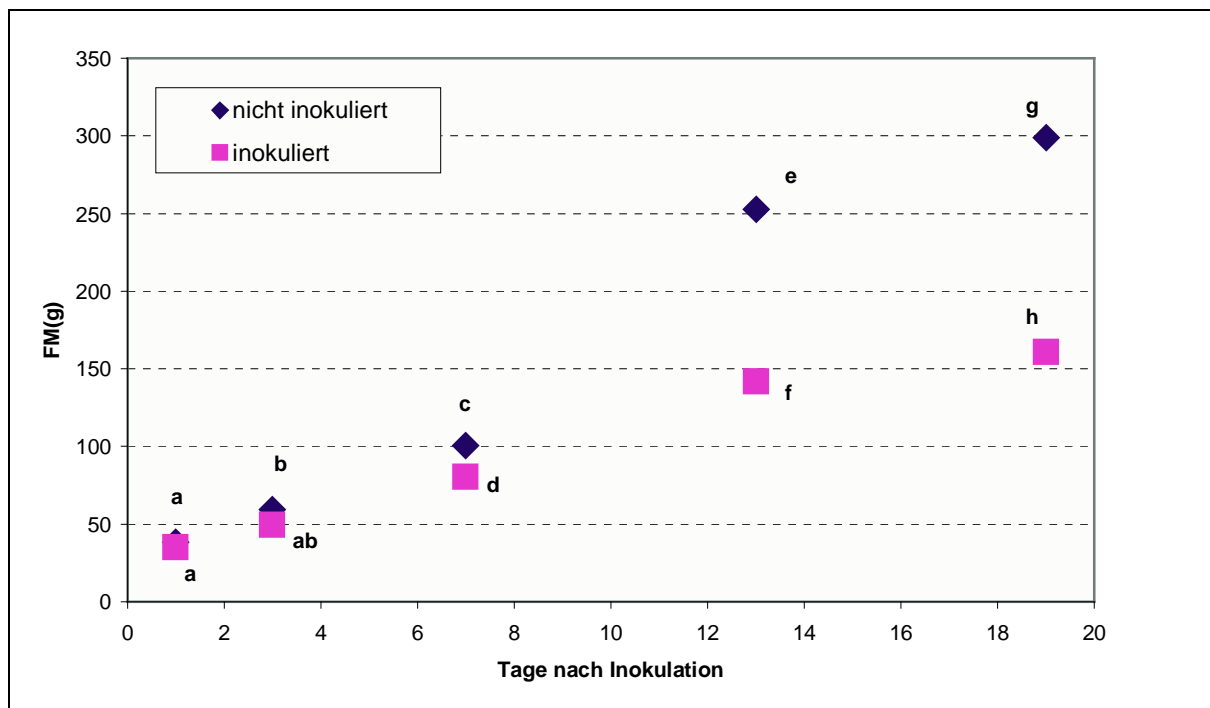


Abbildung 33: Frischmasseentwicklung der Laubblätter in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert g/Schale). LSD-Test;  $\alpha=0,05$ . Kleinbuchstaben: Varianten unterscheiden sich signifikant; krit. Wert Behandlung: 6,8.

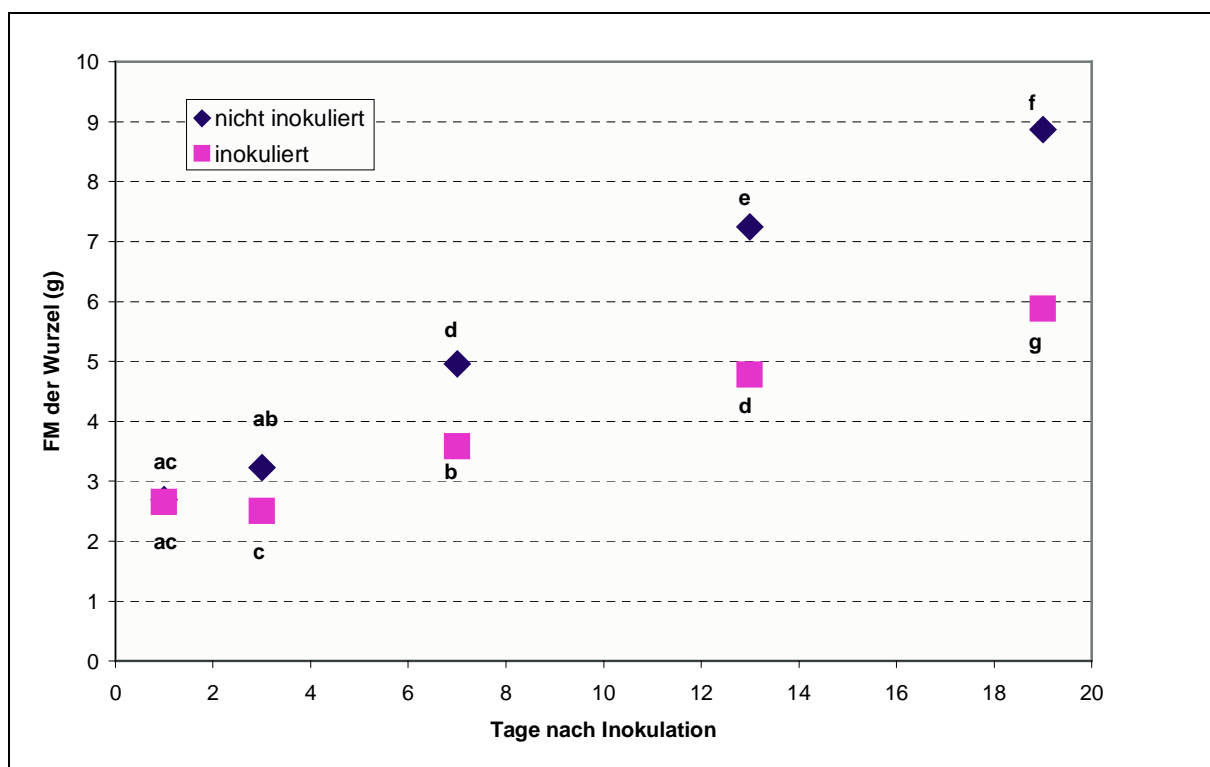
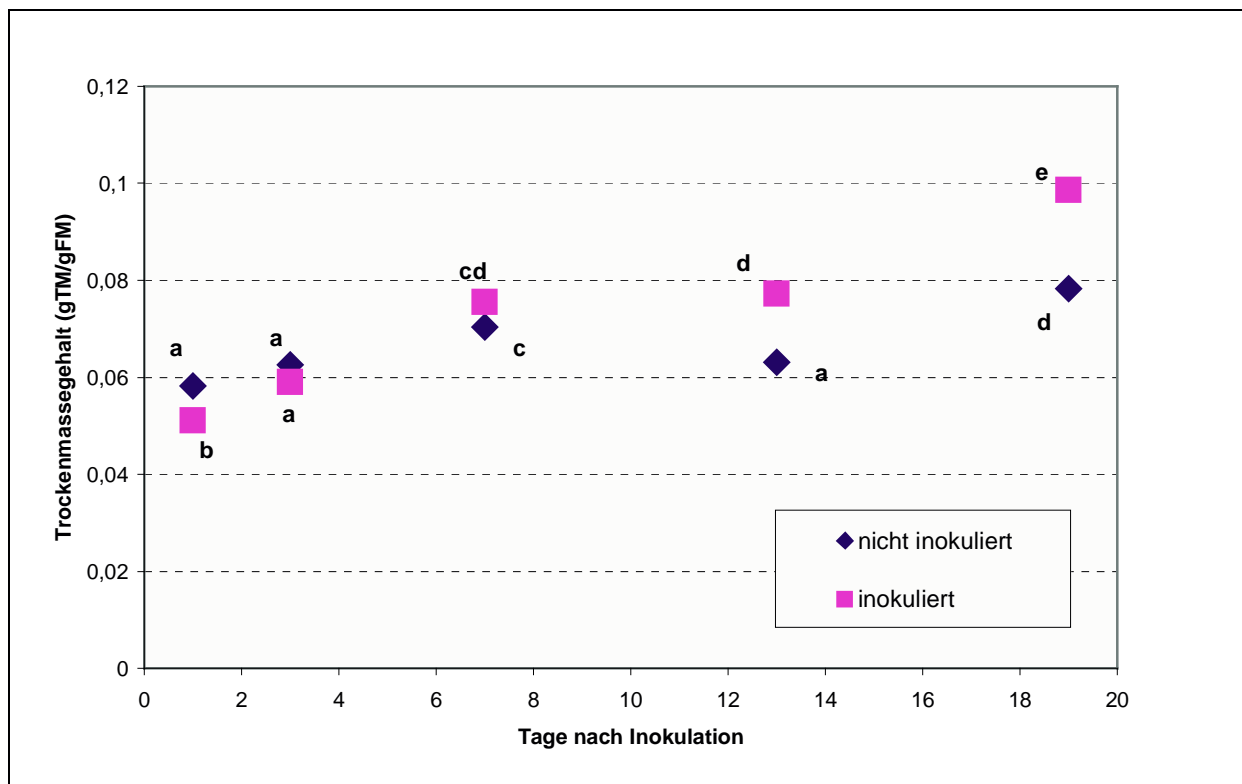


Abbildung 34: Frischmasseentwicklung der Wurzel in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert g/Schale). LSD-Test;  $\alpha=0,05$ ; krit. Wert Behandlung: 0,29.



Ein ähnliches Bild zeigt sich, wenn die Entwicklung der Frischmasse der Wurzeln betrachtet wird (Abbildung 34). Die inokulierte Variante bildet erheblich weniger Wurzelfrischmasse als die nicht inokulierte.

Unterschiede zwischen den beiden Varianten sind auch zu erkennen, wenn man die Trockenmassegehalte betrachtet (s. Abbildung 35). Die Werte liegen zwischen 0,06 und 0,08 g TM/g FM (Pflanzen je Schale) bei der nicht inokulierten Variante und zwischen 0,05 und 0,10 g TM/g FM (Pflanzen je Schale) bei der inokulierten Variante. Die Trockenmassegehalte der beiden Varianten unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ). Es bestehen aber auch signifikante Unterschiede zwischen Trockenmassegehalten an den einzelnen Meßterminen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 35: Trockenmassegehalte in Abhängigkeit von der Zeit; (LSD;  $\alpha=0,05$ ) krit. Wert Behandlung:0,0024; Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede**

#### 4.3.2.2. Messungen zum Einfluß auf die Photosynthese

Zur Beurteilung der Photosynthese wurde der gemessene  $\text{CO}_2$ -Gaswechsel zugrunde gelegt. Der  $\text{CO}_2$ -Gaswechsel pro Aussaatschale ist in Abbildung 36 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Zum gleichen Zeitpunkt unterscheidet sich der  $\text{CO}_2$ -Gaswechsel der nicht inokulierten Pflanzen signifikant von dem der inokulierten Pflanzen. Die Abnahme des  $\text{CO}_2$ -Gaswechsels während des Versuches (Messungen am 13. und 19. Tag nach Inokulation)

ist auf das Blattwachstum und die damit möglicherweise veränderte Strahlungsinterzeption zurückzuführen.

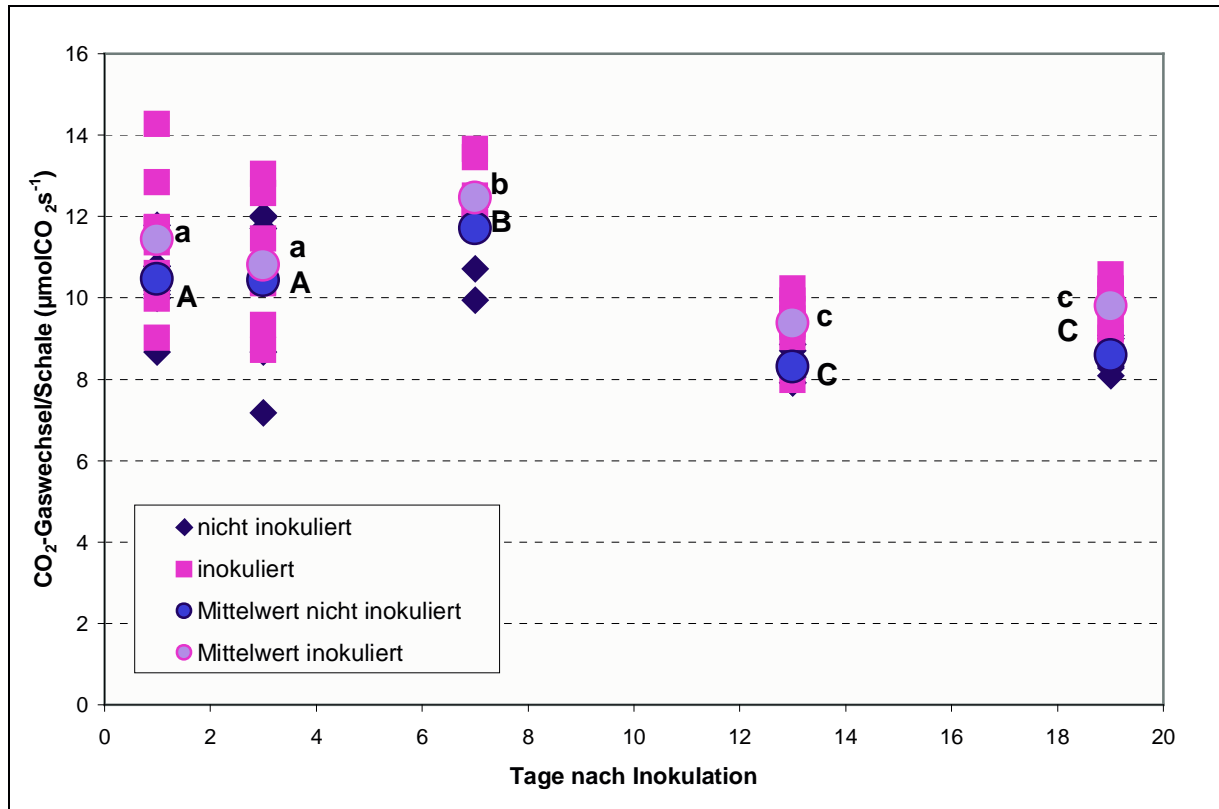


Abbildung 36; CO<sub>2</sub>-Gaswechsel/Schale in Abhängigkeit von der Zeit (µmolCO<sub>2</sub>s<sup>-1</sup>). LSD-Test  $\alpha=0,05$ . Buchstaben: Signifikanzen zwischen den Behandlungen und den Meßterminen; krit. Wert Behandlung: 0,47

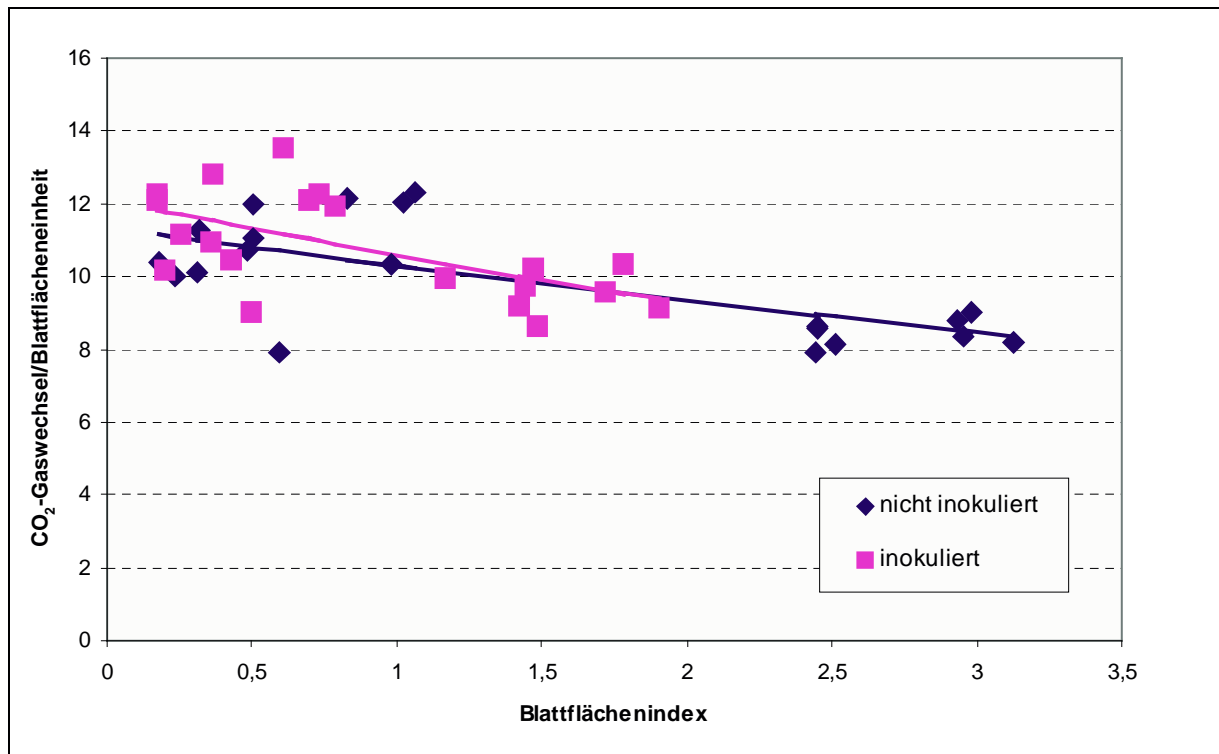


Abbildung 37: CO<sub>2</sub> Gaswechsel/Schale (Bezug Blattflächeneinheit) (µmolCO<sub>2</sub>s<sup>-1</sup>)

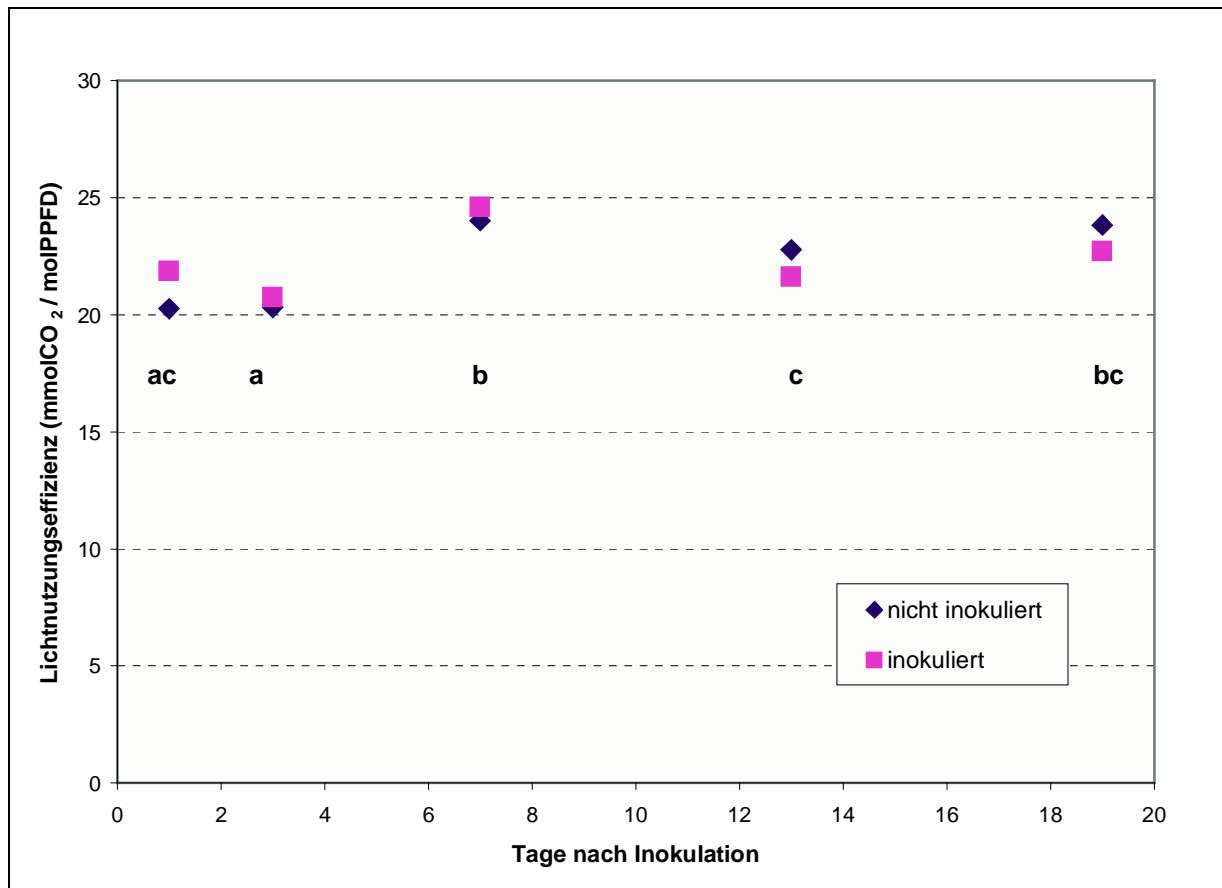
Um zu ermitteln, wie sich der CO<sub>2</sub>-Gaswechsel der zwei Behandlungsvarianten bei gleichem Entwicklungsstadium der Pflanzen verhält, wurde in Abbildung 37 der CO<sub>2</sub>-Gaswechsel/Schale in Bezug zur Blattflächeneinheit dargestellt. Die Werte des CO<sub>2</sub>-Gaswechsels liegen im Bereich von 14 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> und 8 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup> bei einem Blattflächenindex von 0,2 bzw. 3,0. Die Durchführung einer linearen Regression erfolgte nach der Regressionsgleichungen:  $J=a*LAI+b$

**Tabelle 17: nicht lineare Regression: CO<sub>2</sub> Gaswechsel pro Flächeneinheit**

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>R<sup>2</sup></b>		<b>N</b>
nicht inokuliert	-0,96	11,28	44,2	*	20
inokuliert	-1,44	12,05	30,8	*	20

\*p<0,05

Ein Parallelitäts- und Positionstest wurde zum Vergleich der beiden Regressionsgeraden durchgeführt (s. A.1.). Zwischen den beiden Regressionsgeraden lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Es bestehen also keine Unterschiede zwischen den Behandlungen im CO<sub>2</sub>-Gaswechsel pro Blattflächeneinheit. Deutlicher wird der Sachverhalt durch den Vergleich des Quotienten des CO<sub>2</sub>-Gaswechsels und der absorbierten Strahlung (PAR) der nicht inokulierten und inokulierten Variante. Der dabei zugrunde gelegte Extinktionskoeffizient von 0,34 wurde aus dem CO<sub>2</sub>-Gaswechsel pro Pflanze in Abhängigkeit vom LAI mit Hilfe einer nichtlinearen Regression ermittelt und stellt ein Mittel aus den inokulierten und nicht inokulierten Varianten dar (s. A.1).



**Abbildung 38: Quotient aus mmolCO<sub>2</sub>/mol PAR. Extinktionskoeffizient 0,34). Buchstaben: Signifikanzen zwischen den Meßzeitpunkten; LSD Test,  $\alpha=0,05$ .**

Bei der Lichtnutzungseffizienz (Abbildung 38) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den nicht inokulierten Varianten und den inokulierten Varianten zu erkennen. Mit Hilfe einer Varianzanalyse läßt sich feststellen, daß die Behandlung keinen signifikanten Einfluß auf die Lichtnutzungseffizienz hat ( $p>0,05$ ). Einen signifikanten Einfluß auf die Lichtnutzungseffizienz hat allerdings der Meßzeitpunkt ( $p<0,001$ ) (s. A.1.). Es konnte also gezeigt werden, daß die Infektion mit Falschem Mehltau den CO<sub>2</sub>-Gaswechsel der Spinatpflanzen nicht beeinflusst. Allerdings scheint die Behandlung einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen zu haben (Abbildung 32, Abbildung 33).

#### 4.4. Rassenbestimmung

##### 4.4.1. Infektionsversuche

Als Beispiel für die auf dem Testpflanzensortiment untersuchten Isolate ist in Tabelle 18 die Befallsreaktion des Isolates GB1 aus Großbeeren/Brandenburg dargestellt. Hier war auf allen Spinatsorten, mit Ausnahme der siebenfach resistenten Sorten „Lion“ und „Eagle“, Sporulation des Erregers zu erkennen. Das Isolat GB1 konnte demnach als Rasse Pf7 eingestuft werden.

**Tabelle 18: Befallsreaktion des Isolates GB1 auf dem Testpflanzensortiment für *Peronospora farinosa* f. *sp. spinaciae***

		<b>Isolat Großbeeren/Brandenburg GB1</b>
<b>Sorte</b>	<b>Resistenzeigenschaft</b>	<b>Befallsreaktion</b>
Winterreuzen	-	+
Nores	1,2	+
Cauliflay	1,3,5	+
Polka	1,2,3,5	+
Rushmore	1,3,4,5	+
Bolero	1,2x1,2,3,4	+
Spinnaker	1,3x1,2,3,4,5	+
Spicer	1,2,3,4,x1,2,3,4	+
San Felix	1,3x1,2,4,5	+
Clermont	1,2,3,4	+
Lion	1,2,3,4,5,6,7	-
Eagle	1,2,3,4,(7)	-

+ = Sporulation; - = keine Sporulation

Die Identifikation als Pf7 konnte auch für alle anderen mit dem Testpflanzensortiment untersuchten Isolate aus Deutschland festgestellt werden (Tabelle 19). So konnte in den Anbauregionen Berlin, Brandenburg, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Sachsen und Sachsen-Anhalt die Rasse Pf7 nachgewiesen werden. Es zeigte sich darüber hinaus, daß die Rasse Pf7 seit 1998 in Deutschland auftritt. Ebenso wurde ein Isolat aus Italien untersucht und konnte als Rasse Pf7 identifiziert werden.

Tabelle 19: Ergebnisse der Isolatprüfung mit dem Testpflanzensortiment für Falschen Mehltau an Spinat

Geografische Anbauregion	Herkunft/	Isolationsjahr	Rassenidentifikation
Berlin		2000	Pf7
Brandenburg/Großbeeren		1999,	Pf7
Brandenburg/Frankfurt/Oder		2000, 2001	Pf7
Italien		2002	Pf7
Niedersachsen		1998	Pf7
Nordrhein-Westfalen		2000, 2001	Pf7
Sachsen		2000	Pf7
Sachsen-Anhalt		2000	Pf7

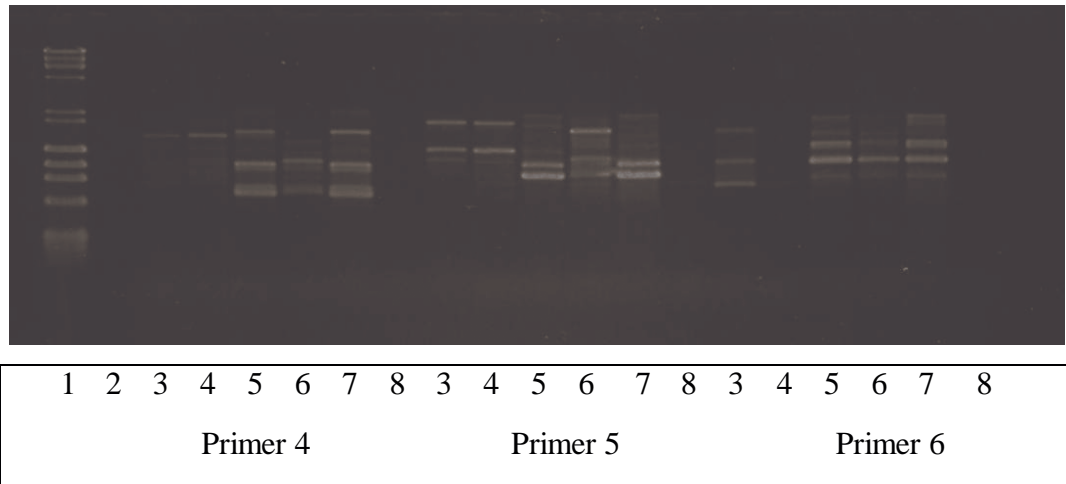
#### 4.4.2. RAPD-PCR

##### 4.4.2.1. Anmerkungen zur Methodik

###### 4.4.2.1.1. Produktion von Sporangienmaterial

Bei den untersuchten Methoden der semi-sterilen Anzucht der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* hat sich nur das Auslegen von Spinatblättern auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen mit anschließender Infektion und Kultivierung im Kühlbrutschrank als günstig erwiesen. Allerdings war die Sporenausbeute im Vergleich zur Produktion der Sporangien an einer wachsenden Pflanze sehr gering. Die anderen getesteten Anzuchtmethoden ergaben keine zufriedenstellend vitalen Spinatpflanzen, so daß eine Vermehrung des Erregers nur sehr vereinzelt möglich war. Dargestellt ist in Abbildung 39 ein Vergleich der Bandenmuster des Isolates GB1 nach Produktion der Sporangien auf wachsenden Pflanzen und auf abgetrennten Blättern in Petrischalen im Kühlbrutschrank. Neben einer Negativkontrolle sind als Referenzen unbefallene und befallene Pflanzenproben abgebildet.

Es ist möglich, die gesunden Pflanzenproben von den pilzlichen Proben zu unterscheiden. Ebenso können bei der befallenen Probe Banden, die dem Pilz zuzuordnen sind, eindeutig erkannt werden. Der Vergleich der zwei Sporangienproduktionsmethoden zeigt, daß bei der Anzucht des Materials im Gewächshaus bzw. in der Klimakammer an der lebenden Pflanze eindeutigere Bandenmuster entstehen als bei der Anzucht an abgetrennten Blättern im Kühlbrutschrank.

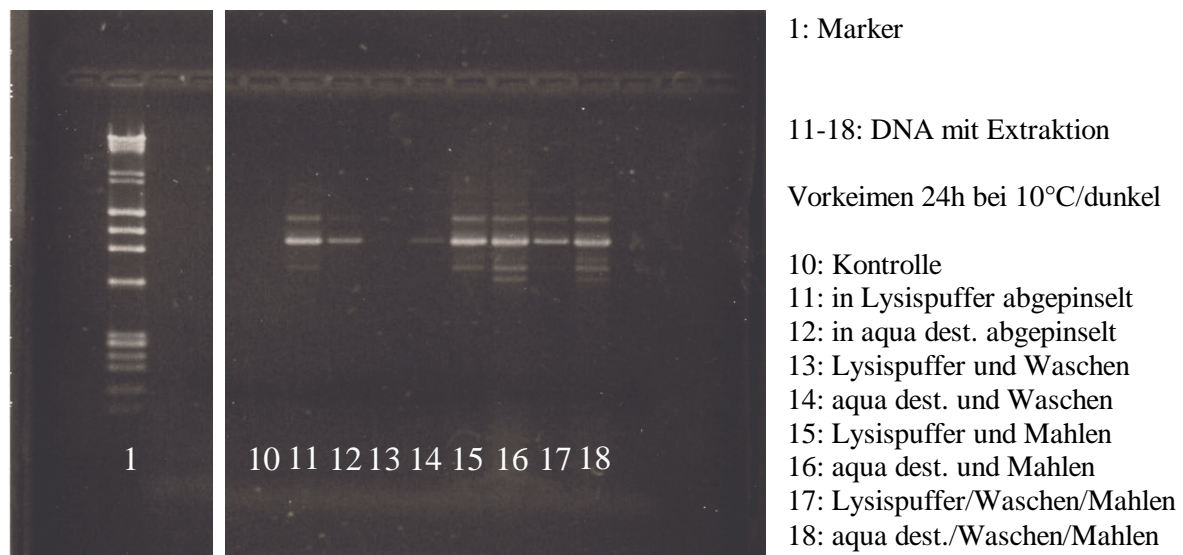


**Abbildung 39: RAPD-Bandenmuster: Vergleich Klimakammer/Gewächshaus Primer 4-6**

- 1: Marker
- 2:-
- 3: unbefallenes Keimblatt
- 4. unefall Laubblatt
- 5: Blatt und Pilz (GB1)
- 6: (GB1) Kühlbrutschrank
- 7: (GB1) Klimakammer
- 8. Kontrolle

#### 4.4.2.1.2. Vorbereitung der DNA

In Abbildung 40 sind die unterschiedlichen Varianten zur Vorbereitung der DNA im Vergleich dargestellt (abgepinselt in Lysispuffer/ dest. Wasser; mit und ohne Waschen; mit und ohne Vorkeimen; mit und ohne Mahlen). Beispielhaft wird hier nur die entstandene Gelelektrophorese für Primer 6 und für die vorgekeimte Variante gezeigt. Die Untersuchung wurde jedoch mit allen 6 Primern und mit den entsprechenden nicht vorgekeimten Proben durchgeführt. Bei allen zeigte sich, daß ein Abpinseln in aqua dest. für die DNA-Extraktion am günstigsten ist. Ein Mahlen der Probe ist besonders wichtig, um ein aussagekräftiges Bandenmuster zu erzielen (Banden 15-18). Auch das Vorkeimen und Waschen unterstützen den Prozeß des Aufschlusses. Das beste Bandenmuster erzielt man demnach durch Abpinseln in aqua dest., Waschen, Vorkeimen und anschließendes Mahlen.

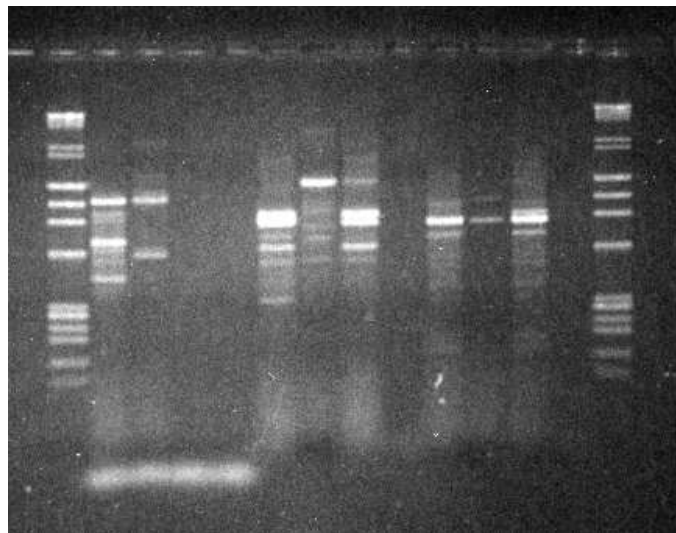


**Abbildung 40: RAPD-Bandenmuster: unterschiedliche Varianten zur Vorbereitung der DNA für die Extraktion (mit Vorkeimen); Primer 6**

#### 4.4.2.1.3. DNA Extraktion

Die Extraktion der pilzlichen DNA geschah nach der phenolfreien Extraktion nach HERING (1997). Weiterhin wurde zum Vergleich eine Extraktion mit dem EZNA Fungal DNA Mini Kit durchgeführt. Eine Extraktion der pilzlichen DNA aus befallenen Pflanzenproben ist dabei möglich, und auch die Extraktion von reinem Pilzmaterial führt zu eindeutigen Bandenmustern (Abbildung 41). Ein Vergleich der beiden Extraktionsmethoden ist beispielhaft für Primer 1 in Abbildung 42 dargestellt. Jeweils zehn Proben wurden nach HERING (1997) und mit dem kommerziellen Kit extrahiert. Die Bandenmuster der beiden Extraktionen stimmen gut überein. Um die Genauigkeit des extrahierbaren DNA-Gehaltes zwischen dem kommerziellen Kit und der Extraktion nach Hering (1997) festzustellen, wurden zunächst von den vorliegenden zehn Proben drei repräsentative Proben ausgewählt. Mit diesen sechs Proben wurde dann eine Verdünnungsreihe hergestellt und anschließend eine PCR zum Oomycetennachweis durchgeführt (Abbildung 44). Auf diese Weise konnten die Nachweisgrenzen für die pilzliche DNA ermittelt werden (Tabelle 20). Bei der oberen dickeren Bande der auftretenden Doppelbanden handelt es sich vermutlich um die pilzliche Bande, während die untere Bande auf die Pflanze zurückzuführen ist (s. Abbildung 43 beispielhaft für zwei Proben). Bei der Extraktion nach HERING (1997) wurde in etwa die zehnfache Menge an Pilz-DNA extrahiert, doch wurde auch pflanzliche DNA extrahiert, da immer eine Doppelbande zu sehen ist. Bei dem Fungal Kit ist die Spezifität gegenüber pilzlicher DNA höher, dieses geht aber zu Lasten der extrahierten DNA-Menge. Für die hier vorliegende Untersuchung mit reinem Pilzmaterial (Sporangien) wurde sich für die Extraktion nach HERING (1997) entschieden.

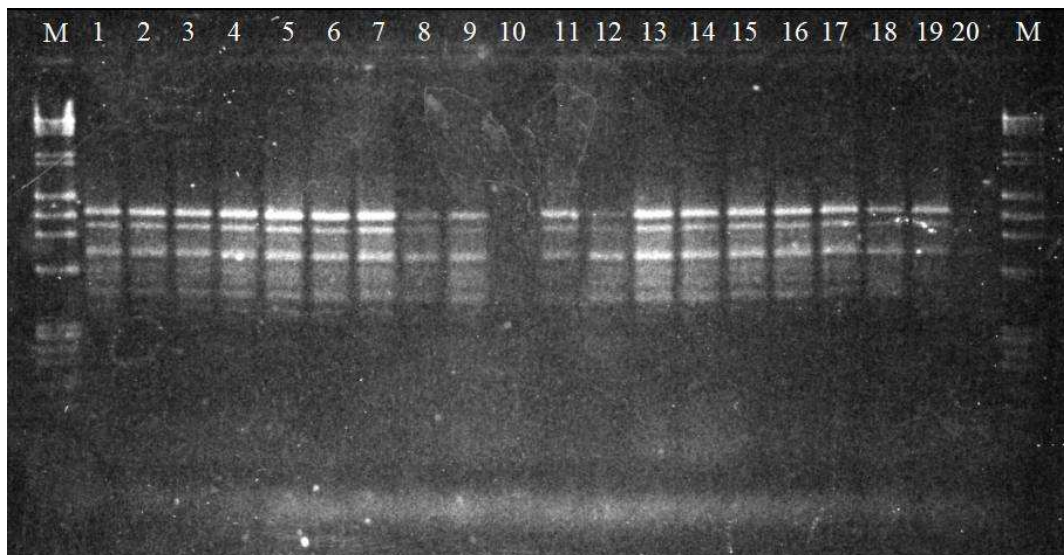




1: Marker  
 2: reiner Pilz  
 3: reine Pflanze  
 4: befallene Pflanze  
 5: Kontrolle  
 .....

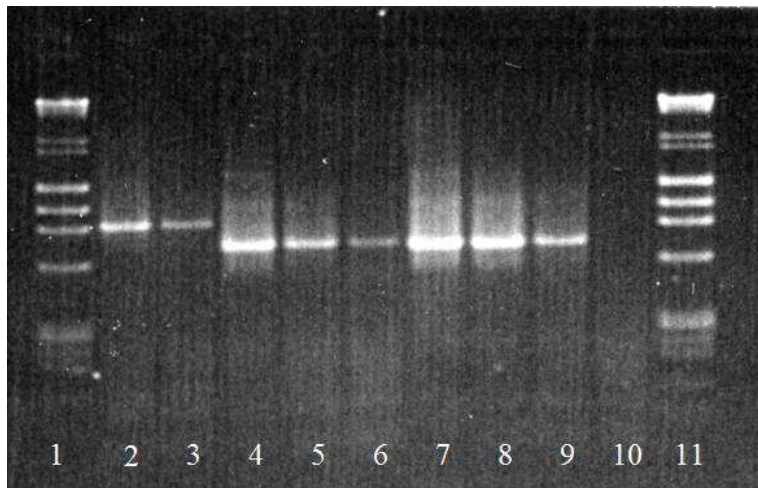
1	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5	1	
Primer 1					Primer 2					Primer 3				

Abbildung 41: RAPD-Bandenmuster: Extraktion mit dem EZNA Fungal Mini Kit



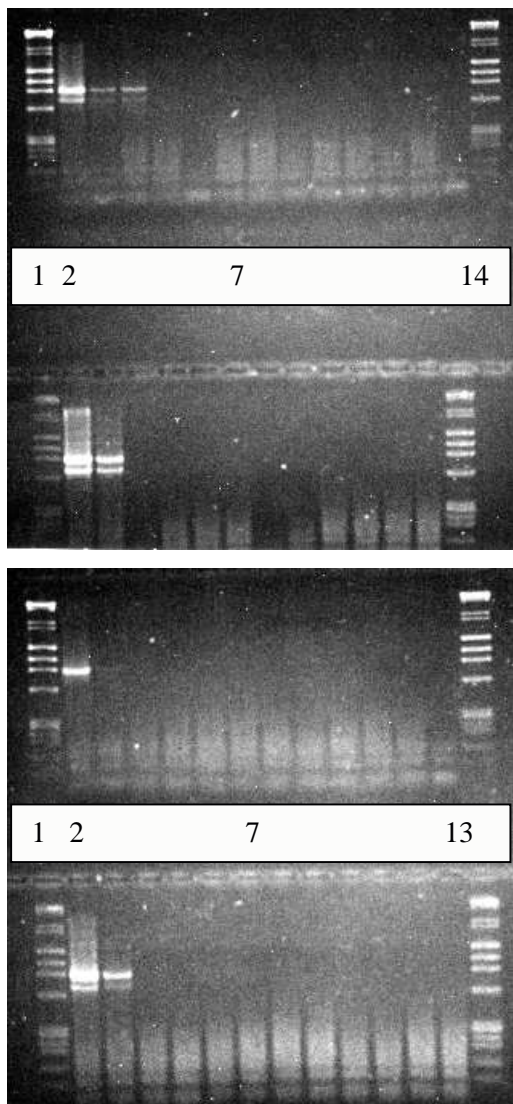
Von links:  
 Marker (M)  
 Extraktion nach Hering (1997): Proben 1-10  
 Extraktion mit EZNA Fungal Mini Kit: Proben 11-20  
 Marker (M)

Abbildung 42: RAPD-Bandenmuster: Vergleich Extraktion nach Hering (1997) (H)/ EZNA Fungal Mini Kit (K)



- 1/11: Marker
- 2: Pilz K:  $10^1$
- 3: Pilz H:  $10^2$
- 4. Pfl. K:  $10^1$
- 5: Pfl. K:  $10^2$
- 6: Pfl. K:  $10^3$
- 7: Pfl. H:  $10^1$
- 8: Pfl. H:  $10^2$
- 9: Pfl. H:  $10^3$
- 10: Kontrolle

Abbildung 43: RAPD-Bandenmuster: Nachweis der Doppelbande in pilzliche und pflanzliche Bande



H4

- 1: Marker
- Verdünnungsreihe:
- 2:  $10^1$
- 3:  $10^2$
- 4:  $10^3$
- 5:  $10^4$
- 6:  $10^5$
- 7:  $10^6$
- 8:  $10^7$
- 9:  $10^8$
- 10:  $10^9$
- 11:  $10^{10}$
- 12:  $10^{11}$
- 13:  $10^{12}$
- 14 (H4): K
- 14/15 (H4): Marker

H5

K4

K5

Abbildung 44: RAPD-Bandenmuster: Verdünnungsreihe der zwei Extraktionsmethoden

Tabelle 20: Nachweisgrenzen der zwei Extraktionsmethoden.

Probe	DNA-Menge (ng)	Verdünnung bei der noch Banden sichtbar sind	Nachweisgrenze (ng)
K4	233,25	$10^1$	23,3
K5	340,75	$10^2$	3,41
K6	1214	$10^1$	29,1
H4	907,25	$10^3$	1,21
H5	291,0	$10^2$	9,07
H7	565,25	$10^2$	5,65

## 4.4.2.1.4. RNA-Verdau

Der Vergleich der Extraktion mit und ohne RNA-Verdau mit allen sechs Primern ist in Abbildung 45 dargestellt. Das Ergebnis zeigt definitiv keinen erkennbaren Unterschied zwischen den beiden Varianten. Somit konnte bei der Extraktion der zusätzliche Schritt eines RNA-Verdau entfallen. Auch das Ergebnis der anschließenden Gelelektrophorese zeigte bei den eingesetzten Primern 1-6 keine Unterschiede zwischen der Probe mit RNA-Verdau und der ohne. Die vorliegenden Banden sind also auf DNA-Abschnitte zurückzuführen. Bei allen Untersuchungen wurde daher auf den weiteren Schritt des RNA-Verdau verzichtet.

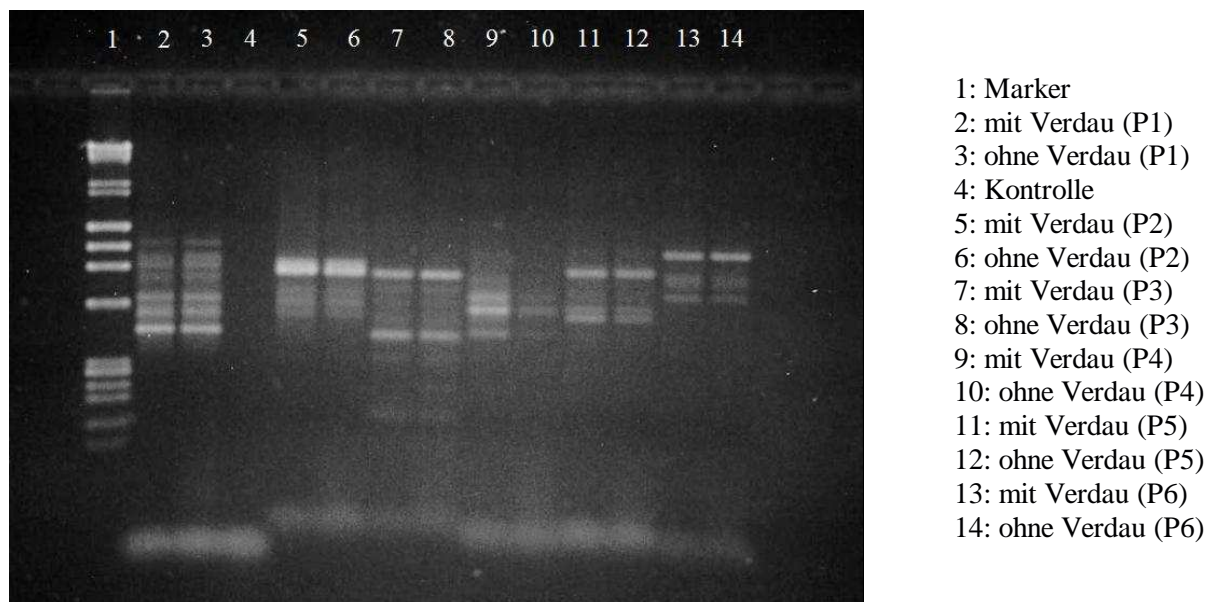
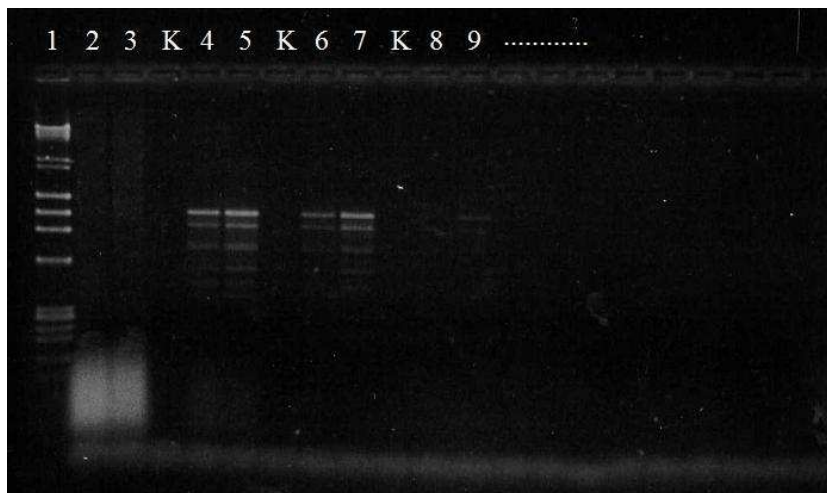


Abbildung 45: RAPD-Bandenmuster: Extraktion pilzlicher DNA mit und ohne RNA-Verdau (Primer1-6)

#### 4.4.2.1.5. Optimale DNA-Konzentration für die PCR

Über das Erstellen einer Verdünnungsreihe von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* Proben wurde die optimale DNA-Konzentration für die PCR ermittelt (Abbildung 46 beispielhaft für Primer 1). Deutlich wird dabei zum einen die Nachweisgrenze für DNA bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. Diese liegt bei einer Verdünnung von 1: 10000, was einem DNA-Gehalt in der PCR von ungefähr 2-2,5 ng/μl entspricht (z.B.: B2 enthält 10230 ng/μl: führt zu 1,0 ng/μl bei Verdünnung, multipliziert mit der Menge, die in die PCR geht: 2,5). Für Untersuchungen mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* erwiesen sich also DNA-Gehalte in der Probe von größenordnungsmäßig 100ng/μl als am besten.



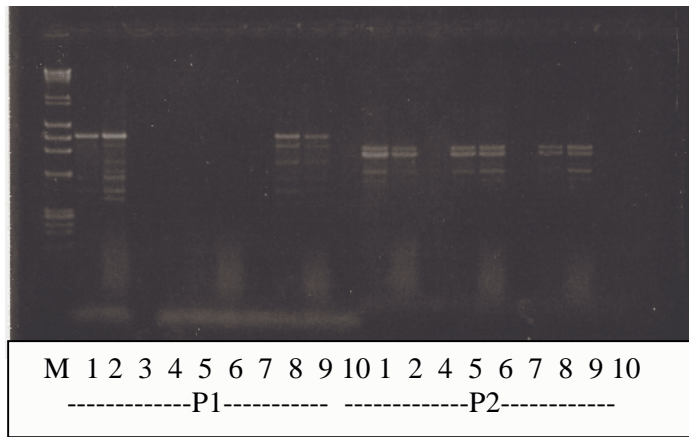
1: Marker  
2/3: 1:10  
4/5: 1:100  
6/7: 1:1000  
8/9: 1:10000  
etc

Beispielhaft Primer 1

**Abbildung 46: RAPD-Bandenmuster: Optimale DNA Konzentration für die PCR**

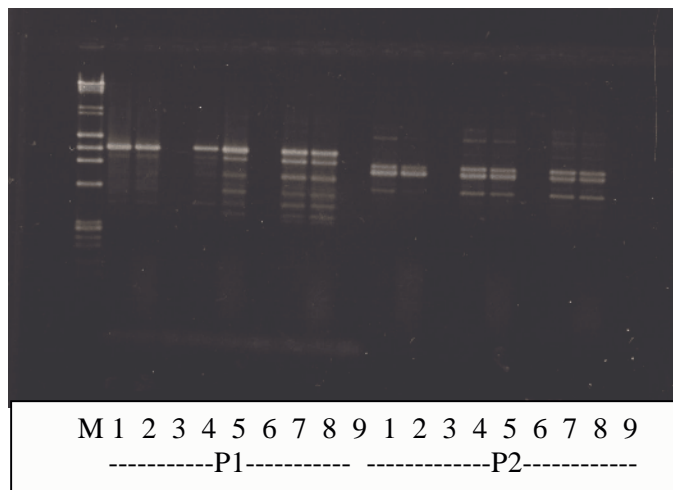
#### 4.4.2.1.6. RAPD-PCR Bedingungen

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der dNTP- Konzentrationen 200, 400 und 600 μM sowie der MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von 1,5 sowie 2,0 und 3,0 mM sind in Abbildung 47 bis Abbildung 49 beispielhaft für Primer 1 und 2 dargestellt. Die Aussage zur dNTP-Konzentration ist eindeutig, denn in Abbildung 47 (bei einer Konzentration von 200 μM) sind die Bandenmuster allgemein sehr schwach, und es erscheinen auch nicht so viele Banden wie bei höheren Konzentrationen. Bei einer hohen Konzentration von 600 μM dagegen (Abbildung 49) waren beim Primer 1 Schmierspuren zu erkennen. Da diese auf eine Übersättigung an dNTP hindeuten und die Spezifität der Reaktion mit steigender dNTP-Konzentration abnimmt, ist für Untersuchungen mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* eine dNTP-Konzentration von 400 μM anzustreben (s. Abbildung 48). Hier sind die möglichen Banden ersichtlich. Bei der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration ist die Aussage nicht ganz so eindeutig. Bei einer Konzentration von 3,0 mM sind jedoch alle Banden offensichtlich zu erkennen.



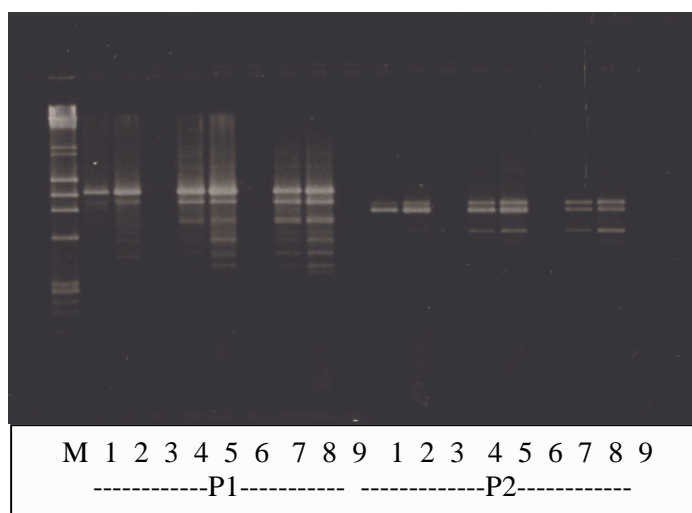
dNTP: 200  $\mu$ M  
 Marker (M)  
 MgCl<sub>2</sub>:  
 1,2:1,5mM  
 3:-  
 4:K  
 5,6: 2,0mM  
 7:K  
 8,9: 3,0 mM  
 10:K

Abbildung 47: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 200 $\mu$ M; MgCl<sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2



dNTP: 400  $\mu$ M  
 Marker (M)  
 MgCl<sub>2</sub>:  
 1,2:1,5mM  
 3:K  
 4,5: 2,0mM  
 6:K  
 7,8: 3,0 mM  
 9:K

Abbildung 48: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 400 $\mu$ M; MgCl<sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2

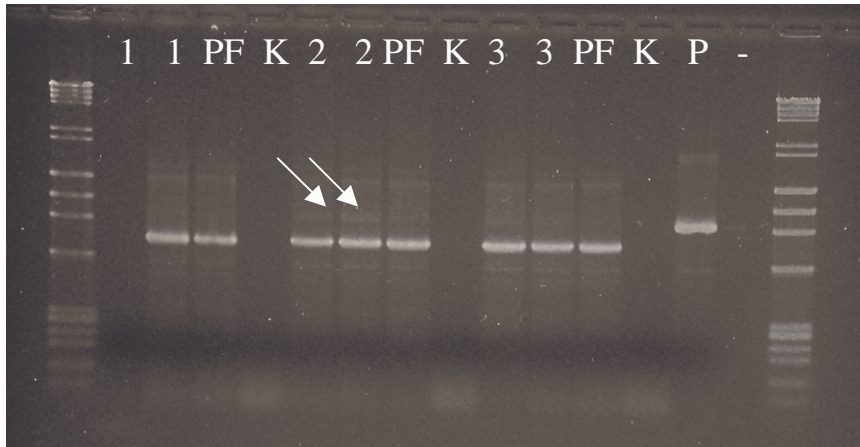


dNTP: 600  $\mu$ M Marker (M)  
 MgCl<sub>2</sub>:  
 1,2:1,5mM  
 3:K  
 4,5: 2,0mM  
 6:K  
 7,8: 3,0 mM  
 9:K

Abbildung 49: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 600 $\mu$ M; MgCl<sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2

Latenznachweis von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in der Pflanze

Schon zwei Tage nach Inokulation ist der Erreger im Pflanzenmaterial nachweisbar (Abbildung 50). Eine Pathogenbande bei ca. 900 bp wird sichtbar (s. Pfeile). Deutlich wird allerdings auch die Problematik dieses Nachweises, denn der Erreger ist drei Tage nach Inokulation nicht sichtbar. Ohne sichtbare Symptome am Probenmaterial ist eine Auswahl, die tatsächlich infiziertes Pflanzenmaterial enthält, schwierig.



1,2,3: Tage nach Infektion

PF: Kontrolle mit gesundem Pflanzenmaterial

K: Nullkontrolle

P: reine Pilzprobe

**Abbildung 50: Nachweis von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in der Pflanze**

#### 4.4.2.1.7. Vorgehensweisen bei der Identifizierung von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* im Feld

##### Anzahl Befallsstellen, die man im Feld für eine vollständige Untersuchung abpinseln muß

Die Sporangienkonzentrationen (Sporangien/ml), die nach dem Abpinseln definierter Befallsstellen (%) erzielt wurden, sind beispielhaft in Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 21: Sporangienkonzentrationen einiger definierter Befallsstellen**

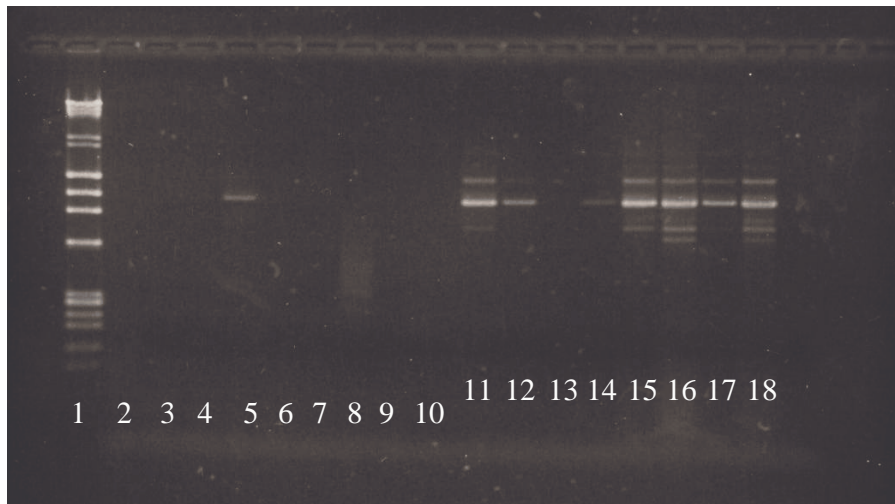
<b>% bef. Blattfläche</b>	<b>Sporangienkonzentration (<math>\times 10^4</math> Sporangien)/ml</b>
30	14
30	36
60	10
60	25

Größenordnungsmäßig befand sich die gewonnene Sporangiensuspension also im Bereich  $10^4$  Sporangien/ml. Dies entspricht auch der Konzentration bei der Ausgangs-PCR: hier befindet sich die Sporangienkonzentration vor der Extraktion im Bereich  $10^6$ , die daraus extrahierte DNA-Menge wird jedoch später um ca. 1:100 verdünnt. Bei Verwendung von abgepinselten Befallsstellen aus dem Feld kann daher die Sporangiensuspension ohne Verdünnung für die RAPD-Untersuchungen verwendet werden.

Es ist also möglich, z.B. mit einem 2 ml Eppendorftube mit 1 ml aqua dest. im Spinatbestand, einige Befallsstellen abzupinseln und das Isolat auf diese Weise zur Bestimmung zu geben. Meistens reichen dabei eine oder zwei Befallsstellen aus, die einen Mindestbefall von mehr als 10% aufweisen.

##### Vereinfachung der Extraktion

Es wurde versucht, den langwierigen Prozeß der Extraktion abzukürzen. In Abbildung 51 sind noch einmal alle Vorbehandlungsmethoden dargestellt. In einem Versuch der Vereinfachung wurde dann das Sporangienmaterial direkt in die PCR gegeben. Die Proben aus diesem Versuch zeigen die Spuren 2 bis 9. Aus dem Ergebnis ist eindeutig ersichtlich, daß ein vollständiger Extraktionsablauf notwendig ist, um geeignete Bandenmuster zu erzielen.



1: Marker

2-10: direkt in die PCR

11-18: mit Extraktion

Vorkeimen 24h bei 10°C/dunkel

2: in Lysispuffer abgepinselt

3: in dest. Wasser abgepinselt

4: Lysispuffer und Waschen

5: dest. Wasser und Waschen

6: Lysispuffer und Mahlen

7: dest. Wasser und Mahlen

8: Lysispuffer/Waschen/Mahlen

9: dest. Wasser/Waschen/Mahlen

10: Kontrolle

11: in Lysispuffer abgepinselt

12: in dest. Wasser abgepinselt

13: Lysispuffer und Waschen

14: dest. Wasser und Waschen

15: Lysispuffer und Mahlen

16: dest. Wasser und Mahlen

17: Lysispuffer/Waschen/Mahlen

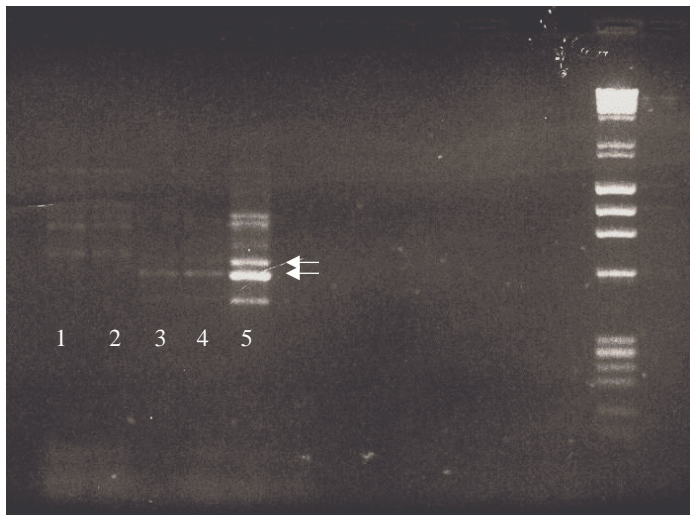
18: dest. Wasser/Waschen/Mahlen

**Abbildung 51: RAPD-Bandenmuster: Vereinfachung der Extraktion von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae***

#### Lagerung des befallenen Pflanzenmaterials

Bei der Untersuchung der Lagerung von befallenem Blattmaterial zeigte sich, daß eine Trocknung des Materials mit anschließender Gefrierlagerung möglich ist, denn die Bandenmuster dieser Proben weisen weiterhin die charakteristischen Banden des pilzlichen Erregers auf (Abbildung 52; s. Pfeile). Doch auch hier sind pflanzliche Banden zu erkennen.





1,2.: Pflanzenmaterial  
 3,4.: Reines Pilzmaterial  
 5: gefrorene Trockenproben

**Abbildung 52: Lagerung des befallenen Pflanzenmaterials (Beispiel Primer 4)**

#### Lagerung des extrahierten pilzlichen Materials

Die Abbildung 53 zeigt die ermittelten DNA-Gehalte in  $\mu\text{l/ml}$  von Mehлтаuprobe, die über einen Zeitraum von einem Jahr sowohl bei  $-80^{\circ}\text{C}$  als auch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Über den Untersuchungszeitraum von einem Jahr läßt sich keine signifikante Abnahme des DNA-Gehaltes feststellen. Ein Unterschied im DNA-Gehalt zwischen der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-80^{\circ}\text{C}$  läßt sich nicht ausmachen, allerdings kommt es zu einer starken Streuung der Werte. Entscheidend für die RAPD-PCR ist ein DNA-Gehalt nach Extraktion von größenordnungsmäßig  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , dieser wird über den gesamten Untersuchungszeitraum erreicht. Bei einer anschließenden RAPD-PCR und Gelelektrophorese sind bei den entstehenden Bandenmustern keine Unterschiede zu verzeichnen. Extrahierte DNA von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* kann also in einem Zeitraum von einem Jahr sowohl bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  bis  $-80^{\circ}\text{C}$  gut gelagert werden.

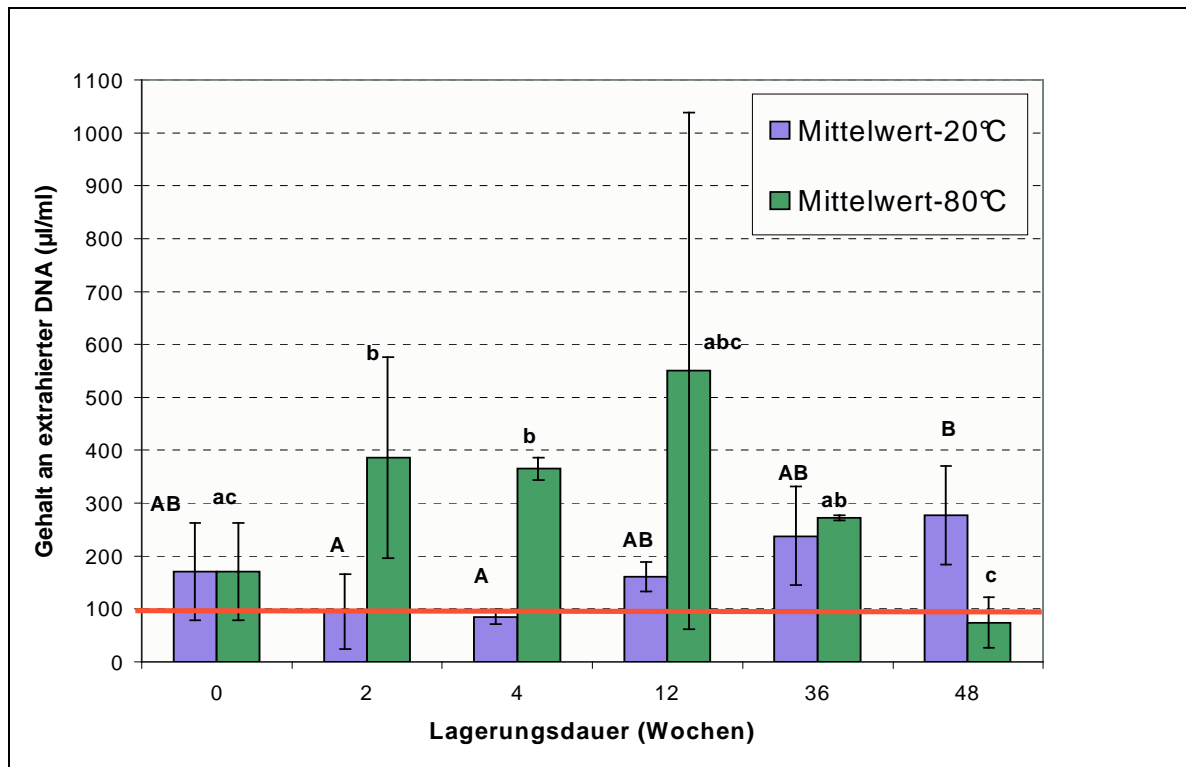


Abbildung 53: Einfluß von Lagerungsdauer und Temperatur auf den Gehalt an extrahierbarer DNA; (LSD –Test;  $\alpha=0,05$ ). Buchstaben: signifikante Unterschiede. Balken: notwendige DNA-Konzentration für die RAPD-PCR

#### 4.4.2.2. Untersuchung der vorliegenden Isolate

Eine Unterscheidung der vorhandenen Rassen ist mit Hilfe der RAPD-PCR möglich. Abbildung 54 zeigt beispielhaft die hierfür relevante Dendrogramm-darstellung für Primer 1.

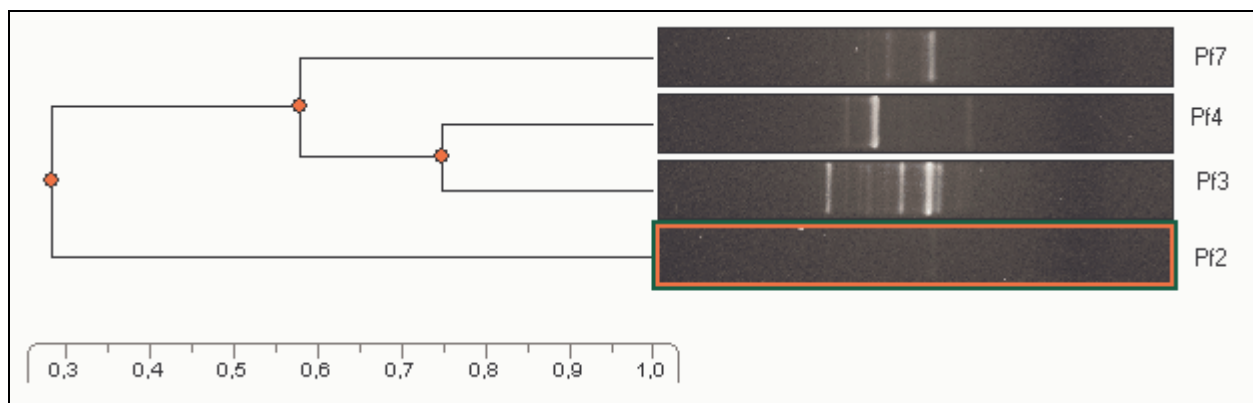
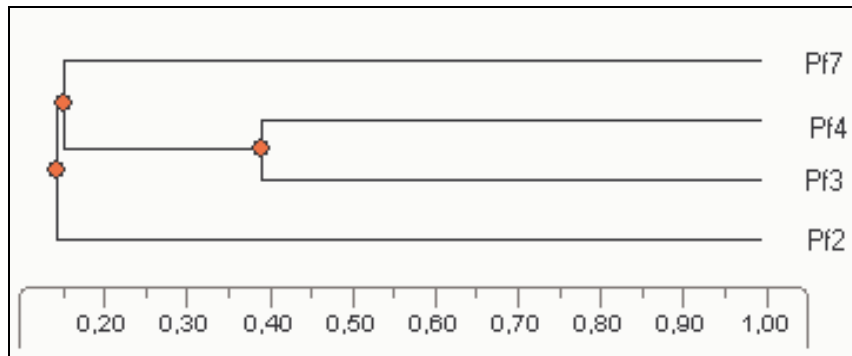


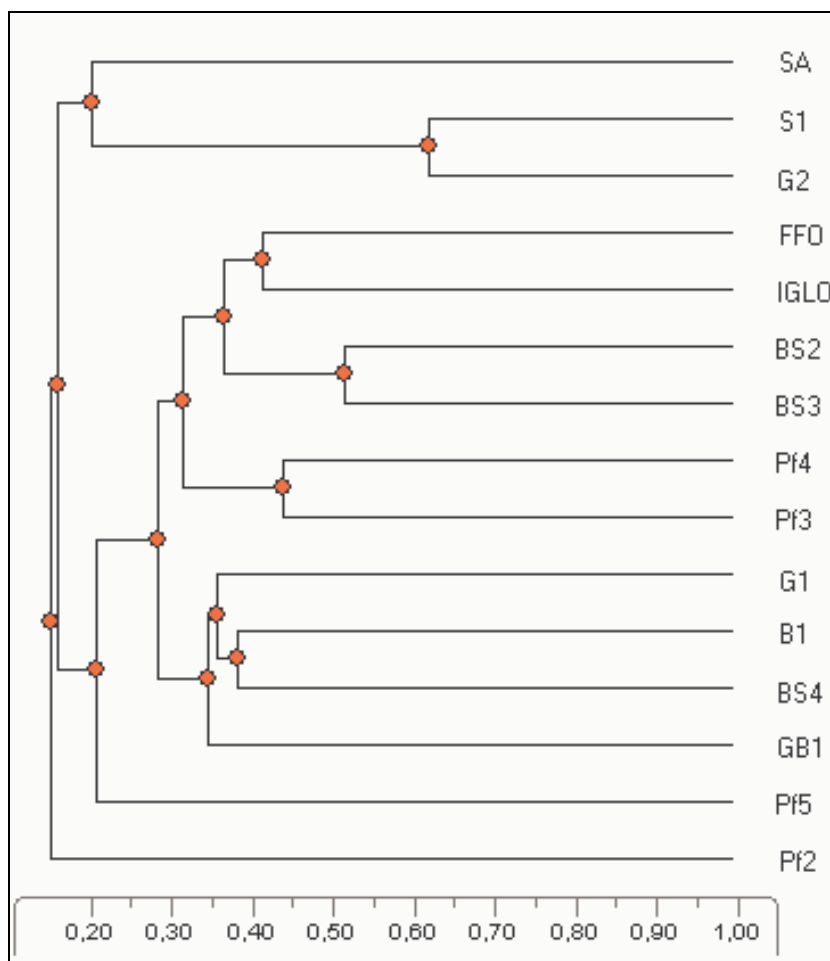
Abbildung 54: Rassenunterscheidung Primer1

Eine Verrechnung aller sechs untersuchten Primer zur Absicherung der Unterschiede (Abbildung 55) bestätigt die Aussage, daß mit diesem Primerset eine Differenzierung möglich ist.



**Abbildung 55: Unterscheidung der Rassen (Verrechnung aller 6 untersuchten Primer)**

Die gesammelten Isolate ließen sich keinem der für die Untersuchungen vorliegenden Referenzisolate zuordnen (Abbildung 56). Die auf einem speziellen Testpflanzensortiment beobachtbare Reaktion war jedoch bei allen Isolaten gleich. Dies deutet an, daß sie Pf7 zuzuordnen sind. Aufgrund der geringen Gesamthomologie von ca. 10% und der höchsten Homologie von ca. 65% zwischen den Isolaten S1 und G2 kann auf eine hohe genetische Variabilität des Erregers geschlossen werden.



**Abbildung 56: Dendrogrammdarstellung der untersuchten Isolate (Verrechnung der 6 verwendeten Primer)**

Mittels RAPD-PCR lassen sich mit dem verwendeten Primer 1 polymorphe Banden bei allen Isolaten ausmachen, diese könnten eventuell charakteristisch für Pf7 sein (Abbildung 57).

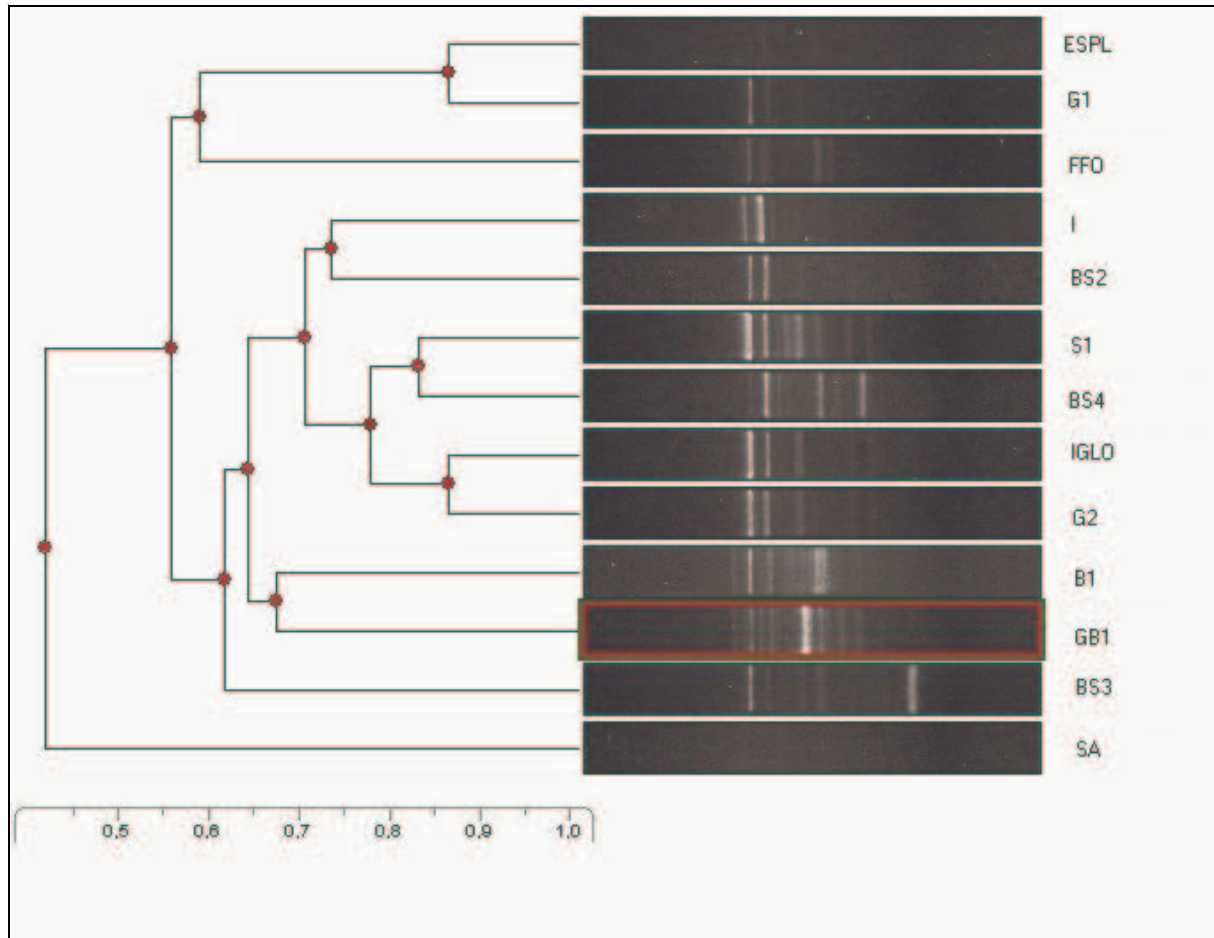


Abbildung 57: Dendrogrammdarstellung der untersuchten Isolate (Primer 1)

## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Datenbasis für ein Prognosemodell für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* geschaffen werden. Verschiedene Teilaspekte, wie die Biologie des Erregers, die Wirt-Pathogen Interaktion, das Wachstum der Wirtspflanze Spinat und die Rassenverteilung des Erregers innerhalb Deutschlands wurden dafür näher untersucht.

### Wachstum Spinat

Zweijährige Anbauversuche mit Spinat schufen die Datenbasis für ein Wachstumsmodell für Spinat als Bestandteil des Prognosemodells für Falschen Mehltau an Spinat. Epidemien eines Pflanzenpathogens beruhen auf dem Zusammenspiel von Wirtspflanze, Pathogen und Klimafaktoren (CAMPBELL UND MADDEN 1990). Eine Integration des Wachstums der Wirtspflanze Spinat in ein mögliches Prognosemodell eines pilzlichen Erregers wie Falscher Mehltau an Spinat ist daher wichtig. So kann z. B. eine genaue Vorhersage von Terminen wie dem Bestandesschluß (ein Zeitpunkt zu dem sich das Mikroklima im Spinatbestand förderlich für einen Befall mit Falschem Mehltau entwickelt) erfolgen und so Änderungen im Epidemieverlauf genau prognostiziert werden. Aussagen zum Entwicklungsstadium eines Bestandes setzen auch den notwendigen Rahmen bei der Terminierung von Fungizidbehandlungen, da Wartezeiten der eingesetzten Pflanzenschutzmittel berücksichtigt werden. Mit Hilfe eines Wachstumsmodells sind auch genaue Ernteprognosen möglich. Bei einem möglichen Mehлтаubefall könnten Wachstumsdaten zusammen mit Befallsprognoseangaben die Entscheidung, ab wann ein befallenes Feld abgemäht werden sollte, erleichtern.

Weiterhin kann eine leichtere Handhabung des Modells durch den Nutzer ermöglicht werden, denn das Modell benötigt weniger Eingabedaten zum Entwicklungsverlauf des Spinatbestandes. Eingeben muß der Nutzer lediglich den Aussattermin und die Spinatsorte, weitere aufwendige Bestimmungen von Entwicklungsstadien direkt im Bestand entfallen und werden vom Wachstumsmodell berechnet. Dadurch kommt es zu weniger Schwankungen bei Terminbestimmungen, wenn unterschiedliche Nutzer das Modell verwenden. Letztlich sind Angaben zur Entwicklung der Wirtspflanze für die Vergleichbarkeit bei der Erhebung von verschiedenen Befallsverlaufsdaten unerlässlich (CAMPBELL UND MADDEN 1990).

Die durchgeführten Versuche zeigten, daß bei einer Aussaatstärke von 300 Pflanzen/m<sup>2</sup> Erträge von ca. 6 kg/m<sup>2</sup> erreicht wurden. Dabei waren keine Unterschiede in der Entwicklung der Spinatsätze über die Anbauperiode zu verzeichnen. Als Langtagspflanze reagiert Spinat im Sommer mit schnellerer Schoßbildung. Diese Tageslängenreaktion wird durch höhere Temperaturen gefördert (KRUG 1991). Auch die Lichtintensität kann die photoperiodische

Reaktion stark beeinflussen (PARLEVIET 1967). Die Stärke der Ausprägung dieser photoperiodisch-thermischen Reaktion ist jedoch auch stark sortenabhängig (KRUG 1991), denn bei der Sorte „Ballet“ ist diese Reaktion kaum auszumachen, da sie, wie die Sortenbeschreibung angibt, besonders schoßfest ist und somit nicht sehr ausgeprägt auf Licht- und Temperatureinflüsse reagiert (BESCHREIBENDE SORTENLISTE 1997). Die Entwicklung der Trockenmasse verläuft zwischen den untersuchten Sätzen einheitlich trotz im Jahresverlauf abnehmender Strahlung. Zwischen den untersuchten Sätzen sind weiterhin keine Unterschiede in der Entwicklung der Frischmasse auszumachen und der Erntetermin liegt bei allen Sätzen ca. 35 Tage nach Aussaat. Einschränkend läßt sich aber feststellen, daß keine sehr frühen Sätze untersucht wurden.

#### Bonitur *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*

Da *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ein Blattpathogen ist und die Hauptschäden durch eine Verfärbung der Blätter entstehen, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die Befallsstärke als Kriterium herangezogen. Zunächst mußte ein geeignetes Boniturschema gefunden werden. BAIRD UND NOMA IN HAU (1989) geben 4 mögliche Funktionen für die Stimulus-Reaktions-Kurven vor: lineare, logarithmische, exponentielle und Potenzfunktion. Bei *Peronospora farinosa* wurde die exponentielle Funktion verwendet. Bei der Entwicklung eines Boniturschemas ist auch die Anzahl der Boniturklassen von Bedeutung. Für die Beschreibung einer Epidemie ist der untere Befallsbereich von Wichtigkeit und sollte daher besonders genau erfaßt werden. Allerdings ist eine zu feine Aufteilung der Befallsklassen durch das menschliche Auge nicht mehr zu unterscheiden. Die Einteilung in acht Befallsklassen wird empfohlen (HAU 1989) und hat sich auch bei dem Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* (Boniturklassen: 0, 0-0,1, 0,1-1, 1-3, 3-10, 10-30, 30- 60, >60%) als günstig erwiesen. Zur Klasseneinteilung wurde eine Prozentskala verwendet, diese bietet die Vorteile, daß Ober- und Untergrenzen klar definiert sind, die Prozentskala läßt sich flexibel aufteilen und sie ist allgemein bekannt und verständlich (JAMES 1974). Hohe Befallsklassen wie 60 % oder >60 % lassen sich hierbei rechtfertigen, da es bei der Bonitur um die Bewertung einzelner Blätter geht und nicht um die gesamte Pflanze. Bei der Bewertung von Blattpathogenbefall gesamter Pflanzen führen Befallsklassen von z.B. 100% zu einer Verfälschung der Ergebnisse, da bei Blattpathogenen der Befall einer ganzen Pflanze höchstens ca. 37% beträgt (KRANZ 1977). So wurde also zusammen mit einer Bilderschablone für die einzelnen Befallsklassen ein allgemeinverständliches Boniturschema für Falschen Mehltau an Spinat geschaffen. Dieses Boniturschema ermöglicht eine vergleichbare und einheitliche Datengewinnung an verschiedenen Standorten und durch verschiedene Boniteure, welches für die Validierung eines Prognosemodells unerlässlich ist.

Bei der Erarbeitung des Boniturschemas für das Freiland wurde als Bewertungskriterium zunächst die Befallshäufigkeit in Erwägung gezogen, denn diese läßt sich in der Regel einfacher und schneller erfassen. Eine Bewertung der Befallshäufigkeit ist jedoch besonders in einem älteren, geschlossenen Spinatbestand nicht einfach zu handhaben. Eine Oberflächenbonitur des Bestandes ist hierfür nicht ausreichend. Spinatpflanzen müßten aus dem Bestand entnommen werden oder der Bestand mit Hilfsmitteln, wie Stäben, durch Wegklappen einzelner Spinatreihen geöffnet werden. Dieses wäre nicht nur arbeits- und zeitaufwendig, es könnte auch zu einer Verfälschung des Befallsverlaufes des Falschen Mehltaus durch menschliche Verteilung der Sporangien führen. Auf eine Bewertung der Befallshäufigkeit im Freilandbestand muß daher bei Spinat verzichtet werden.

Eine Bewertung der Befallsstärke durch eine Oberflächenbonitur nach der oben beschriebenen Prozentskala erfaßt bis zum Bestandesschluß (ca. BBCH 109-110) des Spinatbestandes genau den Verlauf der Befallsentwicklung. Nach dem Termin des Bestandesschlusses wird bei einer Oberflächenbonitur ein Befall in den tieferliegenden Blattschichten nicht berücksichtigt, so daß die Angaben zur tatsächlich befallenen Blattfläche verfälscht werden. Weiterhin ist eine Berücksichtigung aller Blattschichten nicht möglich, da meist die ersten Laubblätter der Spinatpflanzen bei geschlossenem Bestand schon fehlen oder verfault sind. Hier ist dann die Bewertung, ob dieses auf Mehltaubefall zurückzuführen ist, schwierig. Mit dem weiterführenden Boniturschema für Freilandbestände konnte der Befall in tieferen Blattschichten nach Bestandesschluß annäherungsweise berücksichtigt werden, wobei der Befall erst ab dem dritten Laubblatt bewertet wurde.

Bei dem weiterführenden Boniturschema nach Bestandesschluß müssen jedoch die ganz niedrigen Befallswerte kritisch betrachtet werden. Hier ist eine Korrelation zwischen optischer Bonitur und tatsächlichem Befall schwierig, da zwei Möglichkeiten vorliegen: entweder die kleine Infektionsstelle beruht auf einer Infektion durch eine zugeflogene Spore, auf den unteren entwickelten Laubblattpaaren ist daher kein Befall vorhanden, oder die Infektionsstelle entstand durch die Ausbreitung eines Befalls in tieferen Blattschichten. Letzteres ist allerdings bei einem geschlossenem Bestand, der schon Befall aufwies, eher zu vermuten.

### Infektion

In einem ersten Schritt wurde die Sporangienkonzentration ermittelt, mit der ein geeigneter Befall der Spinatpflanzen für die Infektionsversuche mit dem vorliegenden Isolat erzielt werden konnte. Als geeigneter Befall kann bei Blattpathogenen eine Befallshäufigkeit von >90% und eine Befallsstärke von >10% angesetzt werden. Eine Konzentration im Bereich

von  $5-10 \times 10^4$  Sporangien/ml wurde für die weiteren Versuche verwendet. Eine Steigerung der Sporangienkonzentration brachte keine Zunahme der befallenen Blattfläche. Es kam eher zu einer nicht signifikanten Abnahme der befallenen Blattfläche. Bei höheren Inokulumkonzentrationen werden Keimungsinhibitoren als Grund für die gleichbleibende oder abfallende Befallsstärke diskutiert. So konnten SHEPHARD UND MANDRYK (1962) bei *Peronospora tabacina* bei Sporangienkonzentrationen von mehr als  $10^6$  Sp./ml nur eine sehr geringe Keimrate ausmachen, die Keimrate stieg aber bei einer Abnahme der Sporangienkonzentration an und erreichte bei einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Sp./ml den Maximalwert. Für diesen Effekt machten sie inhibitorische Prozesse bei höheren Sporangienkonzentrationen verantwortlich. SATOU ET AL. (1999) setzt die optimale Inokulumkonzentration für Befall mit *P. farinosa* bei maximal  $10^4$  Sporangien/ml an, Bewertungsgrundlage war dabei jedoch die Befallshäufigkeit. Er stellte fest, daß bei einer Befallshäufigkeit von über 50% bei den Pflanzen jeweils mehr als 100 Sporen auf einem Blatt zu finden waren. Dieses ist nach SATOU ET AL. (1999) bei Konzentrationen ab  $10^4$  Sporangien/ml der Fall, diese Konzentration wurde daher vom Autor als ausreichend für eine gute Infektion gewertet. Da in der vorliegenden Arbeit die Bewertungsgrundlage die Befallsstärke war und ein möglichst gleichmäßiger Befall auf allen Blättern erzielt werden sollte, erklärt sich die hier verwendete höher konzentrierte Sporangiensuspension. Zudem wurde auch eine höhere Befallshäufigkeit als die doch recht geringen 50% angestrebt. Auch bei anderen Falschen Mehltauen erwiesen sich Konzentrationen im angesprochenen Bereich als günstig. Bei der Verwendung von Sporangiensuspensionen der Konzentrationen  $10-10^6$  konnte bei *Bremia lactucae* eine größere und schnellere Besiedlung des Wirtspflanzengewebes im Konzentrationsbereich  $10^4-10^6$  festgestellt werden. Es kommt zu einem höheren Gehalt an Mycel im Gewebe, was auf multiple Infektionen durch viele keimende Sporangien zurückzuführen ist. Gleichzeitig kommt es bei der Sporulation des Erregers zu einer höheren Sporulationintensität bei diesen Inokulumkonzentrationen (DICKINSON UND CRUTE 1974).

Grundlegend für das Auftreten des Pathogens und für seine epidemiologische Verbreitung ist das Keimungs- und Infektionsverhalten der Sporangien. Daher sollte das Keimungs-/ Infektionsverhalten in Abhängigkeit von den beiden Einflußfaktoren Temperatur und Blattnässedauer untersucht werden. Zunächst läßt sich die geringe Keimfähigkeit der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ansprechen, die sich durch alle Versuche hindurchzieht. Ähnliches konnten PEGG UND MENCE (1970) auch für *Peronospora viciae* feststellen, hier lag die Keimfähigkeit zwischen 6-51 % mit einem Mittelwert von 26,6 %. DE WEILLE (1963) diskutiert die unterschiedliche Vorbehandlung (z.B. Alter und Umwelt,



Probenahme etc.) der infizierten Pflanzen und auch der Keimbedingungen als Grund für eine starke Variabilität der Keimraten bei den Sporangien der Peronosporales. Es wurde daher in der aktuellen Arbeit angestrebt die Vorbehandlung der infizierten Pflanzen und die Keimbedingungen immer gleich zu gestalten, außer die Versuchsfragen gaben andere Bedingungen vor.

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Keimung der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* bevorzugt bei niedrigen Temperaturen stattfindet. Als günstig haben sich Temperaturen zwischen 5 und 15°C erwiesen. Dieses entspricht auch Angaben anderer Autoren wie (RICHARDS 1939, CORRELL 1994, DAINELLO 1984, BEDLAN 1987). Ein zweifaches Optimum für die Keimung mit einem weiteren Höhepunkt bei 25°C (FRINKING ET AL. 1981; SADRAVI ET AL. 2000) konnte mit diesen Untersuchungen nicht belegt werden. Eine Keimung ist allerdings bis 30°C auf sehr geringem Niveau möglich. Für eine mögliche Prognose bedeutet diese Temperaturabhängigkeit der Keimung, daß gewisse Perioden des Jahres in denen die Temperaturen über 15 - 20°C liegen, z.B im Hochsommer, nur eine sehr geringe Mehltauwahrscheinlichkeit aufweisen. Ebenso bei Perioden, in denen Temperaturen unter 5°C herrschen (Winter), allerdings ist bei diesen Temperaturen auch der Spinatanbau eingeschränkt. Verglichen wurde weiterhin, ob bei längerer Einhaltung der Keimungsbedingungen (24h, 48h) eine höhere Keimrate der Sporangien von *Peronospora farinosa* f.sp. *spinaciae* zu verzeichnen ist. Dieses konnte nur bei niedrigen Temperaturen wie 3 und 5°C festgestellt werden. Eine solche zeitliche Verzögerung der Keimfähigkeit bei niedrigen Temperaturen konnte auch PIETREK (2000) bei *P. valerianellae* feststellen. Ebenso konnte eine Steigerung der Keimrate über die Zeit (6 und 12 Stunden) bei einem südafrikanischen Isolat von *P. parasitica* festgestellt werden (ACHAR 1998). Allerdings sind 6 Stunden auch als relativ kurze Zeitspanne bis zur maximalen Keimfähigkeit zu sehen, bei *P. farinosa* lag die Zeitspanne bei 8-10 Stunden.

Zu berücksichtigen ist auch der Zusammenhang zwischen der Keimung und der tatsächlichen Infektion. Ausdruck einer erfolgreichen Infektion ist die befallene Blattfläche, die von Bedeutung für die Epidemie und für etwaige Ertragsverluste ist. Generell stimmt die Intensität der befallenen Blattfläche mit den Intensitäten der Keimraten bei den unterschiedlichen Temperaturen überein. Nur bei niedrigen Temperaturen wie 5°C ist die erfolgte Infektion sehr viel geringer als die, nach Betrachtung der Keimfähigkeit, erwartete Infektion. Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen Keimungs- und Infektionsverhalten bei niedrigen Temperaturen darauf zurückzuführen, daß die an der Infektion beteiligten Enzyme und Substanzen einen anderen Temperaturbereich abgreifen als die an der Keimung beteiligten, und daß diese Enzyme bei sehr niedrigen Temperaturen wie 5°C nicht so aktiv

sind. So sind an der Keimung der Sporangien Enzyme wie Cutinasen beteiligt, bei der Infektion wirken weiterhin verschiedene hydrolytische und lytische Enzyme (LEBEDA ET AL. 2001). Es läßt sich aber festhalten, daß bei den Oomyceten keine genauen Daten zu den enzymatischen Prozessen bei beginnender Infektion vorhanden sind (LEBEDA UND SCHWINN 1994, LEBEDA ET AL. 2001).

Die in diesem Versuch weiterhin untersuchte Blattnässedauer ist einer der entscheidenden Faktoren für die Epidemiologie von Falschen Mehltauen (SUTTON UND HILDEBRAND 1985). Bei der Untersuchung des Einflusses der Blattnässedauer auf Sporangien von *Peronospora destructor* konnten HILDEBRAND AND SUTTON (1984) feststellen, daß die für die Keimung benötigte Blattnässedauer bei 2-3 Stunden (3°C-21°C) lag, und daß bei höheren Temperaturen eine längere Blattnässedauer notwendig war. Bei *P.destructor* wurde eine beginnende Keimung bei allen untersuchten Temperaturvarianten (10, 14, 18 und 22°C) nach 2 Stunden ersichtlich. Das Maximum der Keimung wurde bei 10°C nach 6 Stunden erreicht, bei 14, 18 und 22 °C nach 10 Stunden. Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* liegen diese Maximalwerte zwischen 8 - 10 h (5, 10, 15 °C), bei höheren Temperaturen bleibt die Keimfähigkeit nach 2 Stunden auf gleichbleibend niedrigem Niveau. Die Blattnässedauer ist demnach nur bei niedrigen Temperaturen ein Einflußfaktor.

Für die Infektion betrug die benötigte Blattnässedauer bei *P. destructor* etwa eine Stunde länger als die für die Keimung notwendige Blattnässedauer. Mit steigender Temperatur nimmt somit die Blattnässedauer für die maximale Infektion zu (HILDEBRAND UND SUTTON 1984). Diese Faustregel läßt sich für *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* nicht aufstellen. Bei einer Temperatur von 10°C wird eine lange Blattnässedauer von 12 h benötigt, bis die maximale Infektion erzielt ist. Allerdings kommt es zu einer stärkeren maximalen Infektion als bei den Temperaturvarianten 5° und 15°C, bei denen die notwendige Blattnässedauer für den Maximalbefall bei 6-8 Stunden liegt.

#### Dauer der Latenz

Zur Vorhersage der epidemiologischen Ausbreitung des Falschen Mehltaus an Spinat sind genaue Aussagen zur Dauer der Latenzperiode notwendig, denn diese hat z. B. einen Einfluß auf die Geschwindigkeit, mit der sich das Pathogen im Bestand ausbreiten kann. Auch für die genaue Terminsetzung von Bekämpfungsmaßnahmen, die im Optimalfall präventiv sein muß, ist die Dauer der Latenzphase von Bedeutung.

Ein Einfluß der Inokulumkonzentration auf die Latenzperiode wird für einige Falsche Mehltäue diskutiert. HILDEBRAND UND SUTTON (1984) beschreiben eine Verkürzung der Latenzperiode bei *Peronospora destructor* von 11 auf 7 Tage bei einer Erhöhung der

Sporangienzahl von 1 auf 100 pro Blatt. Weitere Untersuchungen mit *Peronospora destructor* ergaben, daß eine Erhöhung der Inokulumkonzentration ausschließlich den Zeitraum bis zur Sporulation verkürzte und keine Verstärkung der Sporulationsintensität zur Folge hatte (KOFOET 1988). Auch bei *Bremia lactucae* kann die Latenzperiode von 8 auf 5 Tage gesenkt werden, wenn die Inokulumkonzentration von  $10^3$  auf  $10^6$  erhöht wird (DICKINSON UND CRUTE 1974). Ebenso konnte in der vorliegenden Untersuchung bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* diese Verkürzung der Latenzperiode bei erhöhter Inokulumkonzentration tendenziell festgestellt werden. HILDEBRAND UND SUTTON (1984) schilderten auch, daß dieses Verhältnis zwischen Latenzperiode und Inokulumkonzentration unabhängig von der Temperatur ist. Dies kann für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* nicht völlig bestätigt werden. Bei der hohen Temperaturvariante (25/20°C) und der niedrigen Temperaturvariante (10/5°C) dauerte die Latenzperiode unabhängig von der Inokulumkonzentration jeweils 1 bis 2 Tage länger. Für die Temperaturvarianten (15/10°C und 20/15°C) gilt diese Feststellung jedoch. In diesen Temperaturbereichen stimmt die Aussage mit Ergebnissen überein die SCHERM (1994) mit *Bremia lactucae* feststellen konnte. Versuche, die eine Vielzahl von Temperaturregimen umfassten, zeigten, daß die Temperatur bei *Bremia lactucae* nur einen geringen Einfluß auf die Latenzperiode hat. Dieses widerspricht Angaben, die unter konstanten Temperaturbedingungen für *Bremia lactucae* ermittelt wurden und spricht gegen die Ermittlung von Latenzperioden bei konstanten Temperaturbedingungen.

Die Verkürzung der Latenzperiode kann besonders im freien Feld von Bedeutung sein, da sich nach einigen Infektionszyklen und in einem fortgeschrittenen Stadium des Befalls ein hohes Inokulumpotential für Sekundärinfektionen gebildet hat. Somit verkürzen sich die Infektionszyklen des Erregers.

Der Frage nach der Entwicklungsgeschwindigkeit des Erregers wurde auch bei der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf Inkubations- und Latenzperiode nachgegangen. Zunächst wurde dafür ein Verlauf der Befallshäufigkeit über 4 Tage gemessen. Die Entwicklungsgeschwindigkeit war bei der günstigen Temperaturvariante 15/10°C am höchsten. Schon die Anfangsbefallshäufigkeit lag mit 30% recht hoch und konnte sich in den 4 Tagen auf 90% steigern. Die beiden Temperaturvarianten (20/15 und 25/20°C) zeigten keine große Steigerung der Befallshäufigkeit über den untersuchten Zeitraum. Bei 25/20° lag die maximale Befallshäufigkeit auch nur bei 20%. Die Entwicklungsgeschwindigkeit bei der 10/5°C Variante zeigte, daß es eine Verzögerung der Inkubationsperiode gab. Erst nach 7 Tagen waren erste Symptome zu erkennen, nach Ablauf des Untersuchungszeitraums lag die Befallshäufigkeit allerdings schon bei ca. 70%. So sind also Temperaturen zwischen 15 und 20°C günstig für eine frühe Symptomausprägung und

kürzere Inkubationszeit. Bei niedrigen Temperaturen von ca. 5-10 °C kommt es zu einer Verzögerung der Entwicklung des Erregers, allerdings werden letztlich hohe Befallshäufigkeiten erreicht.

Für die epidemiologische Betrachtung des Pathogens steht allerdings vielmehr die Sporulationshäufigkeit im Vordergrund, denn sie bestimmt das an einer Pflanze und in einem Bestand vorhandene Inokulumpotential. Bei den Temperaturvarianten 15/10 °C und 20/15 °C kommt es hierbei zur höchsten Sporulationshäufigkeit und schnellsten Entwicklung des Pathogens. Bei der hohen Temperaturvariante 25/20 ist sowohl die Befallshäufigkeit als auch die Sporulationshäufigkeit des Erregers eingeschränkt, beide Entwicklungsprozesse sind hier beeinträchtigt. Die Geschwindigkeit der Entwicklung der Sporulationshäufigkeit bei der 10°/5°C Variante wird von der Temperatur stark beeinflusst. Erst 9 Tage nach Inokulation kommt es zu einer sehr geringfügigen Sporulation.

Letztlich wurde bei diesem Versuch die Befallstärke gemessen, da die Chlorose als Gelbanteil des Ernteproduktes einen Qualitätsverlust für den Anbauer darstellt und zu Gewinneinbußen führt. In diesem Fall sind die Temperaturstufen 10/5°C und 15/10°C von Bedeutung, da hier am meisten befallene Blattfläche entsteht. Temperaturbereiche zwischen 15 und 20°C erweisen sich somit als günstig für eine rasche Pathogenentwicklung, starke Sporulation und die Bildung der befallenen Blattfläche. Temperaturen zwischen 5-10°C verursachen einen hohen Prozentsatz an befallener Blattfläche, die für den Ertrag relevant ist, jedoch wenig Sporangien, die für die Epidemie von Bedeutung sind. Ähnliche Temperatureinflüsse wie bei *Peronospora farinosa* f.sp. *spinaciae* zeigen sich auch für andere Falsche Mehltäue, wie z. B. *P. tabacina* (16-24°C optimal für eine frühe Symptomausprägung) (CRUICKSHANK 1963) oder *P. parasitica* (optimale Temperaturen 10-15 °C, Symptomausprägung bei 24°C möglich aber keine Sporulation) (SAHARAN 1997). Insgesamt fördern hier kühle Temperaturen zwischen 10-15 °C die Symptomausprägung und Entwicklung des Pathogens.

Verschiedene Untersuchungen zum Einfluß des Lichtes bei Falschem Mehltau konzentrieren sich auf die Hell/Dunkel-Perioden, die eine Sporulation des Erregers induzieren sollen (z. B. YARWOOD 1937, UOZUMI UND KRÖBER 1967, CRUICKSHANK 1963). Direkte Angaben zur Inkubations- und Latenzperiode liegen dabei nicht vor. Bei der vorliegenden Untersuchung zum Einflußfaktor Licht auf die Inkubations- und Latenzperiode zeigt sich, daß 4 Tage nach Inokulation sowohl erste Symptome als auch erste Sporulation erkennbar werden. Eine schnellere Entwicklung des Erregers bei einer höheren Beleuchtungsstufe (BS3) wird in der Sporulationshäufigkeit 6 Tage nach Inokulation deutlich. Hier liegt die Sporulationshäufigkeit bei ca. 73% und unterscheidet sich signifikant von den bei Beleuchtungsstufe 1 und 2 erzielten Häufigkeiten. Eine Abhängigkeit der Sporulation vom Einfluß des Lichtes wird hier

ersichtlich. Dieses weist auf eine Photosensitivität am Ende der Latenzperiode hin, wie sie von RUMBOLZ ET AL. (2002) für *Plasmopara viticola* diskutiert wird.

Auch bei diesem Versuch wurde die befallene Blattfläche als ein für die Prognose relevanter Aspekt untersucht. Die befallene Blattfläche bei BS1 und BS2 zeigt in Bezug auf die gesamte Blattfläche die gleiche Stärke. Der signifikant geringere Anteil der befallenen Blattfläche bei der Variante BS3 mag vermutlich darauf zurückzuführen sein, daß bei einer hohen Beleuchtungsstärke der Entwicklungszyklus des Pilzes beschleunigt wird. Er beginnt somit schneller mit der Sporulation, zeigt eine höhere Sporulationsintensität (s. auch Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Belichtung), und das Mycelwachstum im Blattgewebe des Wirtes ist eingeschränkt. Eine Erklärung für das tendenziell geringere Pflanzenwachstum bei der BS3 läßt sich nur vermuten. Möglicherweise kommt es aufgrund der verstärkten Sporulation des Erregers mit hohem Verbrauch an Pflanzenmetaboliten zu einem stark gebremsten Pflanzenwachstum.

#### Sporulationsdauer und -intensität

Für einen gezielten Umgang mit dem Falschen Mehltau an Spinat in Form eines Prognosemodells ist eine Bewertung der möglichen Inokulummenge im Feld von Bedeutung (AYLOR 1999). Nicht nur für die Ausbreitung im Bestand spielt die Sporulationsintensität eine Rolle, sondern auch für die Langstreckenverbreitung des Pathogens. Von AYLOR (1999) wurden 3 Hauptfaktoren für eine Langstreckenverbreitung definiert: die Intensität der Sporangienproduktion an der Produktionsstelle, die Verdünnung der freigesetzten Sporenwolke und der Verlust der Sporangienvitalität während des Transports. Für eine Bewertung der Inokulummenge im Bestand ist eine Untersuchung der Sporangienproduktion und Sporulationsintensität pro befallener Blattfläche notwendig. Gleichzeitig gilt es, Klimafaktoren, die einen Einfluß auf die Sporulationsintensität haben könnten, zu identifizieren.

Zunächst wurde die Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Befallsklasse und der Zeit betrachtet. Es wurden dabei Blätter mit Läsionen der Befallsklassen BK 4, 5 und 6 untersucht. Insgesamt produzierte die größte Befallsstelle auch die meisten Sporangien, kleinere Befallsstellen produzierten insgesamt weniger Sporangien. COHEN UND ROTEM (1969) konnten dieses auch für *Pseudoperonospora cubensis* feststellen, je größer die Befallsstelle desto mehr Sporangien wurden gebildet. Viel mehr interessiert für eine Beschreibung einer Epidemie von *P. farinosa* die eigentliche Flächenproduktivität der unterschiedlichen Befallsstellen, daher wurden die Ergebnisse auf eine einheitlich befallene Blattfläche umgerechnet. Hier zeigte sich, daß pro Flächeneinheit die kleineren Befallsstellen mehr

Sporangien produzieren. Möglicherweise ist die Entstehung einer größeren Läsion auf das Zusammentreffen von Myzelien aus mehreren Sporangien zurückzuführen. So mag es im Wirtsgewebe zu einer Konkurrenz um die Nährstoffe kommen, die in den Zellen enthalten sind. Der Pilz konzentriert sich demnach auf die Beschaffung weiterer Nährstoffe und setzt sein interzelluläres Wachstum im Wirtsgewebe fort, so daß nur verringerte Energie in die Sporulation gesetzt wird. Bei einer kleineren Befallsstelle können mehr Nährstoffe erschlossen werden, und der Pilz kann somit verstärkt sporulieren.

Erkennbar wird bei der Untersuchung auch, daß die Sporangienintensität über die Zeit abnimmt. Diese Abnahme kann zum einen auf einen Alterungsprozeß beim Erreger hinweisen, wie sie SINGH ET AL. (1988) für *Peronospora pisi* beschreiben. Hierbei wurden zu unterschiedlichen Terminen Blätter, die Sporulation des Erregers aufwiesen, mit einem Pinsel abgewischt. Zum anderen könnten auch Alterungsprozesse der Pflanze aufgrund der Parasitierung eine Rolle spielen. REUVENI ET AL. (1986) konnten bei *Peronospora tabacina* feststellen, daß die Sporangienintensität mit zunehmendem Alter der Tabakpflanze abnahm. Dieses spielt aber bei der festgestellten Abnahme der Sporulationsintensität bei *Peronospora farinosa* über die Zeit vermutlich eher eine untergeordnete Rolle, da der Untersuchungszeitraum 14 d betrug, und eine Abnahme schon 3 Tage nach Sporulationsbeginn zu verzeichnen war. Diese Abnahme der Sporangien über die Zeit hat allerdings keinen starken Einfluß auf die weiteren Infektionen und die Stärke der Ausbreitung des Befalls (SINGH ET AL. 1988), denn in einem befallenen Bestand sind, aufgrund überlagerter Keimungs-, Infektions- und Sporulationsprozesse, viele Befallsstellen unterschiedlichen Alters zu finden, die unterschiedliche Stärken an Sporangienintensität aufweisen. Für *P. tabacina* konnten AYLOR UND TAYLOR (1983) ermitteln, daß die Variation im Alter der Befallsstellen eine durchschnittliche Sporangienkonzentration insgesamt verursachte. Die ursprüngliche Sporangienkonzentration von 196.000 Sporangien pro Läsion und Tag pendelte sich nach mehreren Infektionszyklen auf den Durchschnittswert von 20.000 Sporangien pro Läsion und Tag ein.

Der Einflußfaktor Beleuchtungsstärke auf die Sporangienintensität wurde in einem weiteren Versuch mit ebenfalls 2 Befallsklassen untersucht. Die drei untersuchten Beleuchtungsstufen (1= 280  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ; 2= 380  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ; 3= 610  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) entsprechen den Werten, die durchschnittlich in den Monaten Oktober (Herbst), März (Frühjahr), Juli/August (Sommer) vorherrschen. Der Anstieg der Sporulationsintensität mit zunehmender Beleuchtungsstärke ist bei einer kleineren Befallsstelle signifikant. Bei der hohen Beleuchtungsstufe und Befallsklasse 6 kommt es im Wirtspflanzengewebe zu keiner Konkurrenz um Nährstoffe, eine größere Menge an für den Pilz verwendbare Nährstoffe können erschlossen werden, der Pilz

ist optimal versorgt und kann daher Energie in die Sporulation setzen. Bei der Läsion der BK 7 ist dieser Anstieg der Sporulation nicht signifikant und nur tendenziell erkennbar. Im Blattgewebe kommt es zu einer Konkurrenz um Nährstoffe, so daß nur wenig Energie und Nährstoffe für die Sporulation des Pilzes zur Verfügung stehen.

Auch die Temperatur kann auf die Sporulationsintensität Einfluß nehmen. Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* bilden sich bei 10°C die meisten Sporangien. Ab 10°C nimmt die Sporulationsintensität des Erregers mit zunehmender Temperatur ab. Diese steht im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen mit anderen Falschen Mehltauen. HARTMANN ET AL. (1983) konnten bei *P. parasitica* eine Sporulationsintensität von 1466-2265 Sporangien/ 45mm<sup>2</sup> bei einer Temperatur von 13°C ausmachen, wohingegen diese Sporulationsintensität bei 18°C nur 82-1042 Sporangien/ 45mm<sup>2</sup> betrug. Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* wurden bei 10°C 400.000 Sporangien/ cm<sup>2</sup> gebildet, bei 27,5 °C weniger als 200.000 Sporangien/ cm<sup>2</sup> (MEY 1971). Die Sporulation von *Pseudoperonospora cubensis* ist zwischen 15 – 20°C am höchsten, im Gegensatz zu *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* kommt es bei wärmeren Temperaturen zur stärksten Sporulation. Bei niedrigen Temperaturen von 5°C kommt es hier zu keiner Sporangienbildung (COHEN UND ROTEM 1969). Auch bei *Peronospora viciae* ist die Sporulation unter 8°C und über 16°C stark reduziert (PEGG UND MENCE 1970). Eine Wechselwirkung zwischen der Temperatur und dem Licht konnte bei der Sporulation von *P. tabacina* von COHEN (1976) beschrieben werden. Er stellte fest, daß bei höheren Temperaturen (19 bis 24°C) die inhibitorische Wirkung auf die Sporangienbildung verstärkt auftrat, während es bei niedrigen Temperaturen (8 bis 15°C) zu keiner Inhibition kam, auch nicht bei den höheren Beleuchtungsstufen.

Beim Mehltau an Spinat kommt es bei 5°C immerhin zu einer geringfügigen Sporulation. Entscheidend für den Temperatureinfluß auf die Sporulationsintensität insgesamt ist jedoch auch die Sporulationsdauer. Diese ist bei 5°C und 20°C bei *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* recht gering (3d), während sie mit ca. einer Woche bei 15°C höher liegt. In dieser Zeit können daher mehr Sporangien produziert werden und auch über einen längeren Zeitraum verteilt werden.

#### Sporangienvitalität

Die Vitalität der Sporangien von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*, die der Pilz auf einer Läsion bildet, ist für die Entwicklung einer Mehltau-epidemie von großer Bedeutung. Dabei muß unterschieden werden, wie sich die Sporangien verhalten, solange sie noch am Sporangienträger sitzen und wie sie sich verhalten, sobald sie gelöst sind und verbreitet werden (ROTEM ET AL. 1985). Die Vitalität der Sporangien, die am Sporangienträger haften,

hat einen Einfluß auf die Länge der Verbreitungsphase der Sporangien, nach der es zu einer neuen Infektion kommen kann. So können die Sporangien sofort verbreitet werden oder auch einige Tage später. Für eine Prognose über ein mögliches Inokulumpotential ist die Dauer der Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von unterschiedlichen Klimafaktoren von Bedeutung. Die Vitalität der losgelösten Sporangien ist für den Kurz- und Langstreckentransport wichtig. Der Kurzstreckentransport betrifft den befallenen Bestand selbst oder Bestände in der näheren Umgebung, in dem die Sporangien ggf. überdauern müssen, bis optimale Witterungsbedingungen für eine Infektion vorherrschen. Für eine erfolgreiche Ausbreitung über lange Strecken müssen abgelöste Sporangien eine noch längere Zeitdauer überstehen. BASHI UND AYLOR (1983). Der Langstreckentransport definiert demnach den möglichen Verbreitungsradius des Falschen Mehltaus an Spinat. So kann sich der Mehltaubefall auf entfernt gelegene Anbaugelände ausbreiten oder sogar auf andere Länder übergreifen.

Auch hier muß die Vitalität der Sporangien in Abhängigkeit von den Klimafaktoren, die bei einer Verbreitung vorherrschen, untersucht werden. So bestimmt die Vitalität beim Transport den späteren Ausbreitungsradius der Epidemie. Keimungsunfähige Sporangien können sich zwar noch über weite Strecken ausbreiten, führen allerdings zu keinen neuen Infektionen. Als Maß für die Sporangienvitalität wurde in dieser Arbeit die Keimung verwendet, ebenso wie bei anderen Untersuchungen zu diesem Thema (BASHI UND AYLOR 1983).

Bei Sporangien, die am Blatt haften, konnte eine abnehmende Keimfähigkeit bei Temperaturen von 5, 15 und 20°C für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* festgestellt werden. Wobei die Keimfähigkeit bei 20 °C besonders rasch abnahm und schon nach 3 Tagen unter 1% gesunken war. Eine Abnahme der Keimfähigkeit mit steigender Temperatur konnte auch bei anderen Falschen Mehltauen wie *P. destructor*, *P. tabacina* oder *Plasmopara viticola* festgestellt werden (BASHI UND AYLOR (1983), CLAYTON (1945), BLAESER UND WELTZIEN (1979)). So nahm z.B. bei *P. destructor* die Keimfähigkeit von 60% bei 10°C (nach 72h) und 20% bei 25°C (nach 48h) auf 0% bei 35°C (nach 10h) ab. Die Haltbarkeit von Sporangien von *P. tabacina* war bei kühleren Temperaturen von 35-40°F (1,7- 4,4 °C) am besten, und sowohl abgelöste als auch am Sporangienträger haftende Sporangien von *Plasmopara viticola* konnten bei niedrigen Temperaturen wie 10 und 15°C eine längere Keimfähigkeit (z.T. über 1 Woche) aufweisen als bei Temperaturen von 20- 30°C. Interessant ist, daß bei *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* die Vitalität der Sporangien bei 10°C über einen Untersuchungszeitraum von 7 Tagen kaum beeinflußt wird. Eine Temperatur von 10°C ist also besonders geeignet für die Überdauerung der Sporen.



Die Sporangien von *Peronospora farinosa*, die vom Sporangienträger abgelöst den verschiedenen Temperaturbehandlungen unterzogen wurden, zeigten schon nach 5 Tagen keine Keimfähigkeit mehr. Ein Temperatureinfluß auf die Keimfähigkeit konnte hierbei nicht festgestellt werden. Dieses stimmt gut mit Untersuchungen an *P. tabacina* überein, die von ROTEM ET AL. (1985) durchgeführt wurden. Sie stellten fest, daß Sporangien, die am Blatt hafteten, besser überlebten als solche, die vom Sporangienträger abgelöst waren. Gleiches wurde auch von BLAESER UND WELTZIEN (1979) für *Plasmopara viticola* festgestellt. Einen Temperatureinfluß konnten sie auch nur für die am Sporangienträger haftenden Sporangien ausmachen und nicht für abgelöste Sporangien. Hier scheinen andere Prozesse die Vitalität der Sporangien zu beeinflussen, wie die Trennung vom Sporangienträger selbst oder eventuell die rel. Feuchte oder die Bedingungen bis zur Bildung der Sporangien (SUSSMANN UND HALVORSEN 1966).

Mehrere Autoren bezeichnen die Beleuchtungsstärke als bedeutsamsten Faktor für die Erhaltung der Vitalität (BASHI UND AYLOR 1983, ROTEM ET AL. 1985, WILLOQUET ET AL. 1996, AYLOR UND SANAGO 1997, WU ET AL. 2000). Für *P. farinosa* liegt nur eine Untersuchung zu diesem Thema von RICHARDS (1939) vor. Hierbei wurden abgetrennte Sporangien bis zu 90 Minuten dem Sonnenlicht ausgesetzt. Schon nach einer Stunde war die Keimfähigkeit auf 0 gesunken. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein erster Versuch unternommen, sowohl am Blatt haftende Sporangien als auch abgelöste Sporangien unter freilandnahen Bedingungen in Klimaschränken zu untersuchen. Bei den Untersuchungen zu den am Sporangienträger haftenden Sporen ergab sich, daß die Vitalität über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten blieb. Ein Abnahme der Keimfähigkeit erfolgte bei den niedrigeren Beleuchtungsstufen. Bei der hohen Beleuchtungsstufe zeigte sich im Untersuchungszeitraum keine Abnahme der Keimfähigkeit. Mögliche Erklärungen für den geringeren Einfluß der Beleuchtungsstärke mag zum einen die Tatsache sein, daß die Sporangien auf der Blattunterseite gebildet werden und somit nicht der vollen Beleuchtungsstärke ausgesetzt sind (WILLOQUET ET AL. (1996). Zum anderen könnten die dicken Sporangienwände, die für die Sporangien der Falschen Mehltäue diskutiert werden (PIETREK 2000), einen Einfluß haben. So beträgt z.B. die Dicke der Sporangienwand bei *Bremia lactucae* etwa 0,07 µm (SARGENT 1981). Für einige Pathogene wird auch eine Pigmentierung für die Unempfindlichkeit gegenüber der Bestrahlung verantwortlich gemacht (ROTEM UND AUST 1991). Beim Falschen Mehltau an Salat (*Bremia lactucae*) ist bekannt, daß die hyalinen Sporangien besonders empfindlich auf Licht und besonders den UV-Anteil reagieren (WU ET AL. 2000). Dieses ist für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* nicht belegt, aufgrund der gräulichen Verfärbung des Mehltausens ist aber eine Pigmentierung denkbar.

Für die gleichbleibende Keimfähigkeit bei der hohen Beleuchtungsstufe mag eine bessere Versorgung mit Nährstoffen aus dem Wirt verantwortlich sein. Sporangien der *Peronospora*-Arten haben die Fähigkeit Nährstoffe aus dem Wirt zu speichern und für die Keimung und die Infektion in das Wirtsgewebe zu verwenden (CRUTE 1981). Licht ist essentiell für die Bildung der Photosyntheseprodukte und Nährstoffe, die für die Sporulation und damit für die Produktion von Sporangien verwendet werden (PALT 1989). Möglicherweise kommt es bei der hohen Beleuchtungsstufe zu einer besseren Photosyntheseleistung und somit zu verstärkter Bildung dieser für die Sporangien wichtigen Nährstoffe. So sind die Sporangien besser versorgt als bei den niedrigeren Beleuchtungsvarianten und bleiben daher länger keimfähig.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Beleuchtungsstärke auf abgelöste Sporangien des Spinatmehltaus ließ sich ebenso wie bei dem Einflußfaktor Temperatur kein Einfluß der Beleuchtungsstärke ausmachen. Innerhalb von 3 Tagen kam es zu einer Abnahme der Keimfähigkeit auf 0%. Dies läßt sich mit Daten, die für die Vitalität von Sporangien von *Bremia lactucae* in Abhängigkeit von der Bestrahlung erhoben wurden, vergleichen. Hier sank die Keimfähigkeit schon nach wenigen Stunden bei Strahlungseinwirkung ab.

Auch hier scheinen andere Faktoren, wie die relative Feuchte oder fehlende Nährstoff- und Wasserversorgung durch das Ablösen vom Sporangienträger und der Pflanze zusätzlich zur Beleuchtungsstärke, eine Rolle zu spielen.

#### Pathogenese unter Freilandbedingungen

Sieben Freilandsätze Spinat konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchung auf ihren Befallsverlauf mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* untersucht werden. Die Befallsverläufe erreichten unterschiedliche Befallsstärken, z.B. 16% oder 1% befallene Blattfläche. Die Befallsstärke nahm jedoch bei jedem Satz über die Zeit zu. Diese Zunahme an befallener Blattfläche kann zum einen auf eine Ausdehnung der Befallsstellen durch Mycelwachstum des Erregers im Blatt zurückzuführen sein. Zum anderen kann sie aber auch auf der Bildung von Sekundärinfektionen nach Verbreitung der Sporangien im Bestand beruhen (CAMPBELL 1999). Bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* konnten drei entscheidende Einflußfaktoren auf diese Zunahmeprozesse der Befallsstärke ausgemacht werden: das Primärinokulum, die Sporulations- und Infektionshäufigkeit und die Kulturdauer.

Das Primärinokulum ist abhängig von vielen Prozessen der Erregerbiologie, die im Verlauf dieser Arbeit unter kontrollierten Bedingungen genauer untersucht wurden. Ausschlaggebend ist zunächst die Infektion durch die Sporangien, die, wie schon erwähnt, von der Temperatur und Blattnässedauer abhängt. Auch die Vitalität der Sporangien, die nach Verbreitung zu

einem ersten Inokulum werden können, und das Alter der Wirtspflanzen spielen eine Rolle für die erste Infektion. Weiterhin legt das Primärinokulum über die Sporulation des Erregers nach erstem Befall den Grundstein für das im Bestand vorhandene weitere Inokulum.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde das Primärinokulum über den Erstbefallswert, also die befallene Blattfläche zur ersten Bonitur, bewertet. Für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* kann schon über die Stärke des Erstbefallswertes eine erste Aussage zur Stärke des Endbefalls gemacht werden. Bei Erstbefallswerten von  $10^{-3}$  % befallene Blattfläche/Gesamtbestand kommt es zu keiner starken Infektion des Erregers, diese tritt erst bei Konzentrationen von  $10^{-1}$ % und  $10^{-2}$  % auf. Bei einer stärker befallenen Blattfläche kommt es zur Bildung einer größeren Menge an Sporangien. Wie schon erwähnt, verkürzen höhere Inokulumkonzentrationen die Latenzperiode und beschleunigen die Infektionszyklen. Zudem wird ein größerer Bestandteil der Blattfläche vom Pilz erschlossen, und es kommt zu höheren Befallswerten. Die unterschiedlichen Erstbefallswerte bei den untersuchten Spinatsätzen erklären sich aus den unterschiedlichen Tagesmitteltemperaturen zur Inokulation. Es konnte gezeigt werden, daß höhere Erstbefallswerte bei Temperaturen von 10 bis 15°C entstehen, während bei höheren Temperaturen nur niedrigere Erstbefallswerte erreicht werden. Dies wird von der Untersuchung zur Keimung und Infektion der Sporangien in Abhängigkeit von der Temperatur, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurde, belegt. Günstig für Keimung und Infektion sind Temperaturen zwischen 5 bis 15°C, bei höheren Temperaturen kommt es nur zur einer sehr geringen Sporangienkeimung und Infektion.

Nässe auf der Wirtsoberfläche ist essentiell für die Etablierung einer Infektion bei vielen Falsche-Mehltauen (POPULER 1981), da sie die Sporulations- und Infektionshäufigkeit des Erregers bestimmt. Dies wird aus den Befallsverläufen, die für *P. farinosa* erhoben wurden, auch ersichtlich, denn nur bei einer hohen Anzahl an Nächten mit einer relativen Feuchte größer 95% und einer hohen Anzahl an Folgenächten mit hoher relativer Feuchte kam es zu starken Mehltauepidemien. Feuchte im Bestand kann sowohl durch Regen als auch durch Taubildung verursacht werden (POPULER 1981). Für verschiedene Mehltau-Erreger gibt es eine unterschiedliche Gewichtung in der Bedeutung der beiden Faktoren: für *Pseudoperonospora humuli* hat sich ergeben, daß Regen die entscheidende Rolle spielt (ROYLE 1970 IN POPULER 1981). Dieses wurde damit begründet, daß Regen nicht nur die Blätter befeuchtet, sondern auch ein Maximum an Sporangienfreisetzung verursacht. Bei *Pseudoperonospora cubensis* hingegen wird Taubildung als entscheidender Faktor diskutiert. Die Sporangien können, auch wenn sie tagsüber freigesetzt werden, bis abends überdauern, wenn Taubildung geeignete Bedingungen für eine Infektion liefert (COHEN UND ROTEM

1969). Für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* sind sowohl Regen als auch Taubildung entscheidend. Es wurde deutlich, daß die relative Feuchte nachts von Bedeutung ist. Hier kommt es zur Taubildung, allerdings kann zusätzlicher leichter Regen die Bedingungen noch verbessern. Wie auch bei *Pseudoperonospora cubensis* können Sporangien des Spinatmehltaus tagsüber freigesetzt werden und dann überdauern, bis abends Taubildung geeignete Infektionsbedingungen liefert.

Die Untersuchungen zur Vitalität der Sporangien in dieser Arbeit zeigten, daß abgelöste Sporangien ca. 3 bis 5 Tage überdauern konnten, während anhaftende Sporangien bei gemäßigten Temperaturen über 9 Tage haltbar waren. Da die Sporangienfreilassung jeweils verstärkt bei Veränderungen in der relativen Feuchte auftritt, kann Regen als ergänzender Faktor für den Befall gewertet werden. Sollte es tagsüber plötzlich regnen, ändert sich die relative Feuchte, die Sporangien werden verteilt und haben gleich optimale Infektionsbedingungen. Letztlich kann es auch aufgrund von Regenspritzern zu einer Verteilung der Sporangien im Bestand kommen (PIELAAT UND VAN DEN BOSCH 1998).

Gezeigt werden konnte auch, daß die relative Feuchte nach Ablauf der Latenzphase des Erregers eine Rolle bei der Entwicklung des Befallsverlaufes spielt. Sporulation kann nach Untersuchungen, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, 5 Tage nach Inokulation einsetzen. Bei den untersuchten Sätzen mit schwachem Endbefall waren nach 5 dpi keine oder nur vereinzelte Nächte mit einer relativen Feuchte größer 95% zu verzeichnen. Sekundärinfektionen wurden somit nicht begünstigt. Bei den Sätzen mit starkem Endbefall zeigten sich nach 5 dpi viele Folgenächte mit einer erhöhten relativen Feuchte. Für Sekundärinfektionen ist die Häufigkeit der Folgenächte mit hoher relativer Feuchte während der Kulturdauer entscheidend. Ebenso nimmt die Sporulationsdauer einen Einfluß auf mögliche Sekundärinfektionen. Die Sporulationsdauer kann unter kontrollierten Bedingungen ca. 11 Tage betragen. In diesem Zeitraum befinden sich also immer Sporangien im Bestand, die zu weiteren Infektionen führen können, wenn günstige Witterungsbedingungen herrschen.

Einige Modelle zur Schätzung von Blattnässeperioden als Grundlage für eine Prognose eines Pathogenbefalls liegen vor (CHTIOUI ET AL. 1999), gleichzeitig sollen sie auch geeignete Aussagen zu Terminen für die chemische Bekämpfung von Pathogenen liefern (CHTIOUI ET AL. 1999, MILLER UND AMADOR 1981). Die relative Feuchte im Bestand erweist sich auch bei *Peronospora farinosa* als der wichtigste Eingabeparameter für eine Prognose des Befallsverlaufs.

Als dritter Einflußfaktor auf den Befallsverlauf von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* kann die Kulturdauer ausgemacht werden. Entscheidend erweist sich dabei, zu welchem Zeitpunkt während der Kultur günstige Sporulations- und Infektionsbedingungen auftreten.

Treten diese zum Ende der Kulturdauer auf, kann durch Variation der Kulturdauer eine Reduzierung des Gelbanteils im Erntegut erreicht werden.

Bei dem Vergleich der räumlichen Befallsausbreitung in einem stark und einem schwach befallenen Satz konnte die raschere Entwicklung des Befalls im Satz mit starkem Endbefall aufgezeigt werden, die sich unter anderem in der Bildung einer Vielzahl von kleineren Sekundärläsionen 2 Wochen nach Inokulation äußert. Bei Untersuchungen zur Sporulationsintensität in Abhängigkeit verschiedener Befallsklassen, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß der Erreger auf kleineren Läsionen pro Flächeneinheit intensiver sporuliert als auf größeren Läsionen. Für den stark befallenen Freilandsatz bedeutet dieses, daß schon 2 Wochen nach Inokulation eine größere Menge an Sporangien im Bestand vorhanden ist als bei dem Satz mit geringem Endbefall. Hier haben sich lediglich vorhandene Läsionen vergrößert, und der Erreger sporuliert weniger effektiv.

Für eine Prognose des Befalls mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* stellen also das Primärinokulum, die Sporulations- und Infektionshäufigkeit und die Kulturdauer die wichtigsten Rahmenangaben dar.

#### Wirt-Pathogen-Interaktion

Das Wirtspflanzenalter ist ein wichtiger Faktor, der die Befallshäufigkeit und auch die Befallsstärke mit Falschem Mehltau beeinflussen kann (LUCAS, HAYTER, CRUTE 1995). Bei den Falschen Mehltauen ist eine Anfälligkeit unabhängig vom Wirtspflanzenalter beschrieben, wie z. B. für *Peronospora destructor* (KOFOET 1988), für einige Falsche Mehltäue jedoch ist eine Altersresistenz beschrieben, z. B. für *P. parasitica* (DAHL-JENSEN 1996), *Bremia lactucae* (LUCAS, HAYTER, CRUTE 1995), *P. manshurica* (WYLLIE UND WILLIAMS 1965) oder *P. tabacina* (REUVENI ET AL. 1986). Einen Hinweis, daß gegenüber *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* auch eine Altersresistenzreaktion des Erregers auftreten kann, erhält man daraus, daß Zuckerrüben eine solche Resistenzreaktion gegenüber *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* aufweisen (MEY 1971). Die Anfälligkeit gegenüber Infektionen kann sich nicht nur durch das Pflanzenalter sondern auch je nach untersuchtem Abschnitt der Pflanze oder den Umweltbedingungen ändern (POPULER 1981). Hinweise darauf, daß auch die jeweiligen Blätter der Spinatpflanzen unterschiedlich auf Mehltaubefall reagieren, lieferten FRINKING AND LINDERS (1986) mit ihrer 3-dimensionalen Darstellung eines Mehltaubefalls in einem Spinatbestand.

Demnach sollte auch für Falschen Mehltau an Spinat die Möglichkeit der stadienspezifischen und altersspezifischen Resistenz, wie sie für andere *Peronospora*- Wirtspflanzenarten bekannt

ist, genauer untersucht werden. Folgende Fragen galt es somit zu klären: sind unterschiedliche Entwicklungsstadien unterschiedlich anfällig gegenüber Falschem Mehltau; sind die entwickelten Laubblattpaare einer Wirtspflanze (KB= Keimblätter, LB 1= erstes Laubblattpaar, LB 2= zweites Laubblattpaar etc.) unterschiedlich anfällig, und spielt hier das Entwicklungsstadium eine Rolle; hat die Temperatur einen Einfluß auf die Anfälligkeit der Wirtspflanze? Ein Bezug zum Submodell Wachstum der Wirtspflanze Spinat als Bestandteil des Prognosemodells für Falschen Mehltau an Spinat wird bei dieser Untersuchung deutlich: über Angaben zum Entwicklungsstadium eines jeweiligen Spinatsatzes können Aussagen zur möglichen Anfälligkeit gemacht werden.

Die Ergebnisse mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* zeigen, daß Pflanzen mit dem Entwicklungsstadium BBCH 102-105 auf Infektionen mit Falschem Mehltau am stärksten reagieren, also die am meisten befallene Blattfläche aufweisen. Pflanzen, die zur Infektion höhere Entwicklungsstadien wie BBCH 107 und 108 aufwiesen, zeigten nur einen geringen Befall. Es ist kein Einfluß auf die Anfälligkeit durch unterschiedliche Temperaturen auszumachen, wie es bei anderen Erregern z. T. beschrieben wird (z. B. KAUL UND SHANER 1989). Die Unterschiede im Befall lassen sich durch den Einfluß der Temperatur auf Entwicklungsprozesse von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*, wie Keimung und Infektion, erklären. So hat sich z. B. aus den oben beschriebenen Untersuchungen eine Temperatur von 10°C als optimal für die Keimung und Infektion erwiesen. Dieses wird mit den Untersuchungen zur Alterresistenz bestätigt, da bei der 15/10°C (Inokulation bei 10°C) die höchste Befallsstärke auszumachen ist. Ein Temperatureinfluß während der Wachstumsphase des Pilzes in der Pflanze ist aber auch auszumachen, denn die Variante 10/5°C zeigt einen stärkeren Befall als die 20/15°C Variante, wobei letztere eigentlich die günstigere Temperatur (15°C) zur Infektion hatte. Genauere Aufschlüsse zur Anfälligkeit erhält man, wenn man die Reaktion der einzelnen Laubblattpaare zum jeweiligen Entwicklungsstadium zur Infektion betrachtet. Keimblätter sind demnach am anfälligsten, allerdings fehlen sie bei älteren Entwicklungsstadien aufgrund der natürlichen oder durch den Erreger zusätzlich verstärkten Seneszenz. Auch das erste Laubblattpaar zeigt sich als extrem anfällig. Die zu verzeichnende höhere Befallsstärke wird von FRINKING UND LINDERS (1986) durch die Position der Blätter erklärt, die sich in der Tiefe eines Bestandes befinden und somit einer höheren relativen Feuchte, geringerer Lichtintensität und kühleren Temperaturen ausgesetzt sind also Bedingungen, die einen Mehltaubefall begünstigen. Bei den Untersuchungen am Spinat kann dieses aber nicht der einzige Grund für den hohen Befall sein, denn der Befall liegt schon zum Entwicklungsstadium BBCH 102 mit 50% relativ hoch, und in einem Freilandspinatbestand wäre das erste Laubblattpaar zu diesem Zeitpunkt noch

nicht von dem restlichen Bestand umgeben. Das zweite Laubblattpaar erwies sich auch noch als recht anfällig, aber ab dem dritten Laubblattpaar ist nur ein sehr geringer Befall nachzuweisen. Der Befall ist besonders stark bei jüngeren Entwicklungsstadien, was mit den Angaben von FRINKING UND LINDERS (1986) übereinstimmt. Diese stellten fest, daß bei den Laubblattpaaren 1 und 2 nur hohe Befallswerte erzielt wurden, wenn die Blätter noch jung waren. Eine Erklärung dafür könnten die von DICKINSON UND CRUTE (1974) angesprochenen Änderungen in der Anatomie, im Nährstoff- und im Wirtsmetabolitengehalt sein. Obligate Parasiten können die Translocationsmuster in der Wirtspflanze verändern, wodurch der Import von Photosyntheseprodukten zum befallenen Pflanzenorgan, hier das Blatt, zunimmt (AYRES 1979, YARWOOD 1967, HABESHAW 1984). Im Entwicklungsstadium BBCH 102 und 105 wachsen die Laubblattpaare 1 und 2 sehr stark, das Blatt und damit der Pilz werden optimal mit Nährstoffen versorgt. Bei höheren Entwicklungsstadien (ab BBCH 107 bis 108) läßt das Wachstum und somit die generelle Photosyntheseleistung der ersten beiden Laubblattpaare nach, auch der Befall mit einem Erreger mag zunächst das Wachstum des Wirtes verlangsamen. Der Pilz, als „sink“ für Nährstoffe vom Wirt, wird schlechter versorgt und wächst im Wirtsgewebe langsamer. Junge Blätter ( $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{2}$  der vollen Größe) sind ebenfalls als „sink“ zu betrachten und importieren Nährstoffe wie Kohlenhydrate und Proteine aus unteren älteren Blättern (LIBBERT 1993). Eine schlechtere Nachlieferung aus älteren Blättern könnte der Grund für den geringen Befall bei höheren Entwicklungsstadien sein. Eine eindeutige Altersresistenzerscheinung läßt sich bei Spinat nicht ausmachen, obwohl es zu bemerken gilt, daß sich der geringe Befall zum Entwicklungsstadium BBCH 108 signifikant von dem Befall der jüngeren Entwicklungsstadien unterscheidet. Wie bei *Peronospora farinosa* f. sp. *betae* (MEY 1971) ist das Entwicklungsstadium von Bedeutung für die Anfälligkeit der Spinatpflanze, allerdings ist auch die Position des Blattes im Bestand zu berücksichtigen.

Ziel der Untersuchung in der Gaswechselkammer war es, festzustellen ob sich ein Befall mit *P. farinosa* f. sp. *spinaciae* reduzierend auf die Photosyntheseleistung der Spinatpflanzen auswirkt. Eine mögliche Reduktion der Photosynthese und damit einhergehend ein geringes Pflanzenwachstum führt zu einer Ertragsverminderung, die bei einer Ertragsprognose berücksichtigt werden müßte (BOOTE ET AL. 1983, CAMPBELL AND MADDEN 1990, HAU 1995). Gleichzeitig müßte das im Prognosemodell für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* integrierte Wachstumsmodell angepaßt werden.

Mit den vorliegenden Untersuchungen in der Gaswechselkammer konnte festgestellt werden, daß die Pflanzen der infizierten Variante ein geringeres Pflanzenwachstum, sowohl der

oberirdischen als auch der unterirdischen Pflanzenteile, aufwiesen. Auch die Trockenmasse dieser Varianten war erheblich geringer als bei den gesunden Varianten. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Gewichten der infizierten und gesunden Variante traten ca. 8 Tage nach Inokulation auf, einem Zeitpunkt zu dem die Sporulation des Erregers einsetzte. Nach YARWOOD (1967) ist diese Reduktion der Frischmasse auf die Sporulation des Erregers zurückzuführen, besonders bei Falschen Mehltauen kann diese recht hoch sein. Bei Falschem Mehltau an Spinat kann diese Gewichtsreduktion bis zu 48% betragen, was bei den vorliegenden Untersuchungen ca. 19 Tage nach Inokulation ebenfalls beobachtet werden konnte. YARWOOD (1967) begründet die Gewichtsreduktion mit einem Zusammenbruch des befallenen Wirtsgewebes zur Sporulation und mit einer Umwandlung des Pilzmycels in Sporangien. Bei Versuchen zur Sporulation von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* konnte gezeigt werden, daß die Befallsstelle an der der Erreger sporulierte, noch über 1 Woche sporulationsfähig blieb, eine Zerstörung des befallenen Gewebes erst zu diesem Zeitpunkt massiv einsetzte. Die Gewichtsreduktion z. B. der Frischmasse ist demnach bei Falschem Mehltau an Spinat eher auf die Umwandlung von Mycelinhalt in Sporangien zurückzuführen. Die Betrachtung der Trockenmassegehalte zeigte jedoch, daß die infizierten Pflanzen eine größere Menge an Trockenmasse einlagerten. Der Faktor Licht, der sich in den beiden Versuchskabinen um ca. 13% unterschied, wurde zunächst näher zur Begründung betrachtet. Zum einen dürfte jedoch die geringere Bestrahlung in der Kabine mit der infizierten Variante (ca. 13% weniger) nicht so einen extremen Effekt auf die Pflanzen haben. Zum anderen war die spezifische Blattmasse ebenso wie der Trockenmassegehalt sehr hoch, diese Werte hätten bei zu wenig Bestrahlung sehr viel geringer ausfallen müssen, als bei den gesunden Pflanzen aus der zweiten Versuchskabine. Ein Zusammenhang zwischen Befall mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* und dem reduzierten Wachstum der Spinatpflanzen kann festgestellt werden. Das Ausmaß dieses reduzierten Wachstums hängt dabei vornehmlich vom Entwicklungsstadium zum Befallstermin ab. Junge Pflanzen werden oftmals leichter infiziert und zeigen daher auch die stärkste Reduktion des Wachstums (AYRES 1981). Dieses kann auch bei der vorliegenden Untersuchung mit Spinat ersichtlich werden, denn die Pflanzen wurden in einem sehr jungen Stadium infiziert. Ältere Pflanzen, wie beim Versuch zum Anfälligkeitsverhalten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium ersichtlich, zeigen keinen starken Mehлтаubefall.

Bei vielen pilzlichen Erregern ist eine Abnahme der Photosyntheserate nach Infektion, oder eine zu Beginn der Infektion kurzfristige Zunahme der Photosyntheserate gefolgt von einer Abnahme, nachgewiesen worden (LUCAS 1998, INGRAM 1981). Untersuchungen zum Einfluß eines Befalls mit Falschem Mehltau auf die Photosynthese liegen nur wenige vor (INGRAM



1981). SHTIENBERG (1992) konnte z. B. bei der Untersuchung des Befalls mit *Pseudoperonospora cubensis* der Gurke eine erhebliche Abnahme der Photosyntheserate und einen leichten Abfall der Transpiration ausmachen. Bei einem Befall von *Pennisetum typhoides* mit *Sclerospora graminicola* zeigte sich eine Abnahme der Photosyntheserate um 42,1%. Dabei war die Chlorophyllmenge in den befallenen Blättern auch erheblich reduziert (GARG UND MANDAHAR 1976). Auch bei Befall mit *Plasmopara viticola* an Wein (*Vitis vinifera*) zeigt sich eine Abnahme der Photosyntheserate (GIUNTOLI UND ORLANDINI 2000), gleichzeitig konnten auch Änderungen in der source-sink Beziehung zwischen Wirtspflanze und Pathogen nachgewiesen werden (BREM ET AL. 1986).

Ein tatsächlicher Einfluß von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* auf die Photosynthese der Wirtspflanze Spinat kann mit den vorliegenden Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Sowohl bei der Betrachtung des CO<sub>2</sub> Gaswechsels in Abhängigkeit von der Temperatur/ Zeit als auch bei der Betrachtung der Lichtnutzungseffizienz kann kein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden und der infizierten Variante aufgezeigt werden. Oftmals wird ein Bezug zwischen befallener Blattfläche mit reduziertem Chlorophyllgehalt und einer Abnahme der Photosyntheserate diskutiert (LUCAS 1998). Bei Befall mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ist dieses nicht eindeutig erkennbar. Die Befallsstellen zeigen zwar Aufhellungen, was auf eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes schließen läßt, aber eine Abnahme der Photosynthese wird nicht ersichtlich. Als biotropher Parasit erhält *P. farinosa* zunächst die Funktionen der Pflanzenzellen aufrecht, und eine Kompensation für fehlende Nährstoffe kann aus gesunden Blättern erfolgen.

Für eine Prognose des Pflanzenwachstums muß daher keine abnehmende Photosyntheserate berücksichtigt werden. Allerdings spielt der Zeitpunkt der Infektion eine Rolle. Bei einer Infektion in einem jungen Entwicklungsstadium, wie BBCH 102-103, kann es zu einer Reduzierung im Pflanzenwachstum kommen. Bei älteren Pflanzen ist dieser Effekt vernachlässigbar (AYRES 1981). Bei jungen Pflanzen gilt es dann weiterhin die nachfolgenden Klimabedingungen zu betrachten, sind diese ungünstig für einen Mehltaubefall, kommt es zu keinen Neuinfektionen. Möglicherweise kann die Pflanze dann mit der neugebildeten Blattmasse die Wachstumsreduktion durch den ursprünglichen Befall kompensieren.

#### Rassenbestimmung (Infektionsversuche, Methodisches, RAPD Ergebnisse)

Eine Variabilität der Virulenz ist für viele Falsche-Mehltau-Pilze beschrieben, und daraus resultiert die Existenz von unterschiedlichen Rassen bei verschiedenen Mehltau-Arten (LEBEDA 1994). Auch bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* wird diese Variabilität in den bis heute bekannten sieben Rassen ersichtlich.

Traditionell wird eine Auswahl an verschiedenen Wirtspflanzensorten zur Identifizierung der unterschiedlichen Erregerrassen verwendet (COLLINGE, SLUSARENKO 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zunächst alle erhaltenen Isolate auf dem für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* vorliegenden Testpflanzensortiment überprüft. Diese Methode hat sich als sehr zeit- und arbeitsaufwendig erwiesen. Zunächst muß eine Vermehrung des Erregers erfolgen. Zudem war nur die Testung auf ganzen Pflanzen aussagekräftig, welches zugleich das Vorhandensein unterschiedlicher Rassen mit standardisierbaren Bedingungen voraussetzt. Eine gleichzeitige Testung vieler Isolate ist daher nicht möglich. Schwierigkeiten mit der Identifizierung mittels Testpflanzensortiment ergeben sich auch, wenn eine neue unbekannte Rasse auftritt. Da ein Testpflanzensortiment in sich abgeschlossen ist, lassen sich nicht ohne weiteres Wirtspflanzensorten mit neuen Resistenzeigenschaften hinzufügen oder alte Testsorten entfernen (BROWDER ET AL. 1980). Beim Auftreten einer neuen Rasse muß also auch das Testpflanzensortiment neu erstellt bzw. erweitert werden.

Die Rassenverteilung innerhalb Deutschlands erweist sich als einheitlich, alle untersuchten Proben ließen sich als Pf7 identifizieren. Dies läßt sich zum einen auf das Sortenspektrum an Spinat zurückführen, das in den letzten Jahren in Deutschland verwendet wird. Ein Großteil der verwendeten Sorten waren 4-fach resistent. Das Auftreten der Rassen Pf1 bis Pf4 war damit nicht möglich. Die Rasse Pf6 ist bislang nur auf die USA beschränkt. Eine Erklärung dafür, daß keine Isolate der Rasse Pf5 gefunden wurden, mag mit einem Konkurrenzverhalten der Rassen Pf5 und Pf7 zu erklären sein, wobei sich die Rasse Pf7 durchgesetzt hat. Konkurrenzphänomene bei Spinat- Mehltau- Rassen sind für die Rassen Pf 1, Pf 2 und Pf 3 beschrieben worden (SCHUM UND REIMANN-PHILIPP 1982), könnten also auch hier eine Rolle spielen. Allerdings liegen auch keine beschreibenden Literaturquellen vor, die überhaupt ein eindeutiges Auftreten der Rasse Pf5 in Europa sichern. Berichtet wird lediglich von dem Auftreten der „Rasse 5“ in Europa, jedoch nach der Nomenklaturfestlegung 1999 durch die NAK Tuinbouw ist dieses die Rasse Pf7. Denkbar ist somit, daß bei Literaturzusammenfassungen (z. B. CORRELL ET AL. 2003) zum Auftreten der jeweiligen Mehltaurassen, die Rassen Pf5 und Pf7 aus Europa identisch sind.

Eine schnelle Anpassung von Erregern an neue Umweltbedingungen erfolgt nach VAN DER PLANCK (1982) besonders bei Erregern, die eine asexuelle Vermehrungsphase aufweisen, wie es bei *Peronospora farinosa* der Fall ist. Im Gegensatz zu der verbreiteten Annahme, daß eine Anpassung an neue Umweltbedingungen über die sexuelle Vermehrungsphase erfolgt, argumentiert VAN DER PLANCK (1982), daß in einer Erregerpopulation alle möglichen Genotypen vorhanden sind und nur eines Selektionsdruckes bedürfen, um zu- oder abzunehmen. Die schnelle Durchsetzung einer neuen Rasse erfolgt somit über die asexuelle

Vermehrungsphase. Dieses zeigt sich bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in den immer kürzeren Abständen (z. T. 4 Jahre) bis zur Entstehung neuer Rassen in den letzten Jahren.

Durch den Anbau von Sorten mit unterschiedlichen Resistenzeigenschaften kann die Überwindung dieser Resistenzen verlangsamt werden (HOFFMANN ET AL. 1994). So sind seit der Entdeckung der Rasse Pf7 inzwischen fast sieben Jahre vergangen, und es hat sich keine Rasse Pf8 entwickelt. Dies kann unter anderem mit der Anbausituation in größeren Anbaugebieten erklärt werden. Zwar sind sieben-fach resistente Sorten auf dem Markt vorhanden, oftmals werden jedoch noch in großen zusammenhängenden Anbaugebieten bis zu 60% vier-fach resistente Spinatsorten verwendet (SCHRÄDER 2002, mündliche Mitteilung). Aus der vorliegenden Identifizierung der Isolate aus Deutschland kann geschlossen werden, daß der Anbau von Sorten, die Resistenzgene gegenüber den Rassen Pf6 und eventuell Pf5 besitzen, nicht notwendig ist und somit eine Schonung dieser Resistenzen erreicht werden kann. Sorten mit den Resistenzen 1,2,3,4,5 und 7 sind für den Anbau erhältlich, wogegen Sorten mit einer ausschließlichen Resistenz: 1,2,3,4 und 7 nicht gesichert sind. So sind z.B. bei dem in dieser Arbeit verwendeten Testpflanzensortiment die Resistenzen der Sorte Eagle nicht klar definiert bzw. in weiteren Arbeiten unterschiedlich definiert (CORRELL ET AL. 2003). Die Resistenzeigenschaft 1,2,3,4 und 7 ist somit unklar. Die ebenfalls im Testpflanzensortiment enthaltene Sorte Naktuibouw12 (Resistenzen: 1,2,3,4 und 7) war für diese Arbeit nicht lieferbar und wurde bei weiteren Untersuchungen mit dem Sortiment durch die Sorte Scenic (Resistenzen: 1,2,3,4,5, und 7) ersetzt (CORRELL ET AL. 2003).

Weiterhin läßt sich anhand von Proben aus dem Jahr 1998 folgern, daß die Rasse Pf7 zu diesem Zeitpunkt schon in Deutschland vorhanden war. Die erste Entdeckung dieser Rasse in Europa erfolgte 1996 in Italien (NALI 1998). Diese mag ein Hinweis auf eine eventuelle luftbürtige Verbreitung von Sporangien des Erregers sein, die sich nach Deutschland verbreitet haben. Wahrscheinlich ist der Erreger auch mit dem Erntegut Spinat eingeschleppt worden. Italien besitzt die größten Spinatanbauflächen und ist einer der wichtigsten Lieferanten für frischen Spinat nach Deutschland. Jährlich werden von dort 4.300-5700 t Spinat eingeführt (RAMPOLD 2000).

Aufgrund der oben angesprochenen Problematik der Identifizierung mittels Infektionsversuchen wurde nach einer Methodik gesucht, die weniger zeitaufwendig, weniger arbeitsintensiv, leichter auf neuauftretende Rassen anpassbar und handhabbar ist. Die RAPD-PCR wird inzwischen schon seit einiger Zeit dazu verwendet, genetische Unterschiede, die Rassenpopulationen bei Pathogenen differenzieren, zu untersuchen (FOSTER ET AL. 1993). Daher wurde die RAPD- Methodik für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* angewendet, um eine geeignete Methode zur Rassendifferenzierung zu erhalten.

Bei der Produktion der Sporangien für die PCR hat sich gezeigt, daß nur die Kultivierung des Erregers auf gesunden, in Erde gewachsenen, Pflanzen geeignet ist. Daher muß eine mögliche Kontamination der Proben durch Pflanzenbestandteile und Mikroorganismen minimiert werden. Bei der Sporangienengewinnung wurde mit den unterschiedlichen Schritten, wie sauberes Abpinseln, mehrmals Waschen, Vorkeimen und Mahlen versucht, eine Verunreinigung möglichst gering und die gewonnene Menge an DNA möglichst groß zu halten. Die Frage der Verunreinigung ist in der Literatur umstritten, zum einen wurde eine Verunreinigung erst bei 5 % Fremd-DNA nachgewiesen (MCDERMOTT IN DAHL-JENSEN 1996), zum anderen wird eine Veränderung der RAPD-Ergebnisse schon durch kleinsten nicht nachweisbaren Bakterienbesatz diskutiert (DYER UND LEONARD 2000). Dieser Bakterienbesatz wird oftmals als spezifisch und somit auch charakteristisch für die jeweilige Probe bezeichnet, allerdings mag dieser Besatz bei jeder Probe unterschiedlich ausfallen und nicht charakteristisch sein (DYER UND LEONARD 2000). Da jedoch die in dieser Arbeit erzielten Hauptbandenmuster stabil waren, wurde daher, wie für andere Falsche Mehltäue (z.B. PIETREK 2000), die RAPD-Methode weiterverfolgt.

Da RAPD-Untersuchungen bei niedrigeren Annealing-Temperaturen und mit unspezifischen Primern ablaufen, sind sie sehr empfindlich gegenüber Reaktions- und Thermocyclerbedingungen (EDEL 1998). Für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* wurden deshalb standardisierte Reaktionsbedingungen optimiert. Als optimal erwies sich dabei eine DNA-Konzentration von ca. 100 ng, eine Magnesiumchlorid- Konzentration von 3 mM und eine dNTP- Konzentration von 400µM. Dies liegt gut in den Konzentrationsbereichen, die für die jeweiligen Reaktionsbestandteile angegeben werden (WILLIAMS ET AL. 1993, ANNAMALAI 1995, EDEL 1998).

Bei der Wahl der Extraktionsmethode war das Ziel, möglichst effektiv Pilz-DNA zu extrahieren. Dabei wird unterschieden in Pilzmaterial, das sich ausschließlich aus Sporangien zusammensetzt und Mycel, welches aus der Pflanze stammt. Hierzu wurde die Extraktionsmethode nach HERING (1997) mit einem kommerziellen Extraktionskit verglichen, das den Anspruch stellte, nur pilzliche DNA zu extrahieren. Um den Anteil pilzlicher DNA nach der Extraktion bei beiden Methoden zu bestimmen, wurde auf eine ITS-PCR (internal transcribed spacer region) zurückgegriffen. Die ITS -Regionen haben sich als sehr geeignet erwiesen, Pilze auf Art- bis Gattungsebene zu unterscheiden. Sie sind anfällig für Mutationen, weil sie keine Proteincodierungseigenschaft aufweisen, diese Rate der entstandenen Mutationen entspricht oft in etwa der Anzahl an vorkommenden Arten eines Erregers (COOKE ET AL. 2000). Die bei der ITS-PCR verwendeten Primer sind spezifisch, und die Methode ist besonders für die Unterscheidung pilzlicher Erreger geeignet. Die in dieser Arbeit

verwendeten Primer ITS 4 zusammen mit ITS 6 wurden bei der phylogenetischen Unterscheidung von *Phytophthora* und anderen Oomyceten verwendet. ITS 6 ist dabei modifiziert, um eine effizientere Amplifikation der Peronosporales zu ermöglichen (COOKE ET AL. 2000). Diese PCR resultiert in einer einzigen Bande bei ca. 900 Basenpaaren (COOKE AND DUNCAN 1997). Mit dieser Methode konnte die pilzliche DNA nach beiden Extraktionsmethoden sichtbar gemacht werden. Bei der Extraktion nach HERING (1997) wurde allgemein mehr DNA extrahiert, allerdings wurde auch eine zweite Bande sichtbar, die durch Extraktion pflanzlicher DNA entstand. Es konnte deshalb bestätigt werden, daß diese Methode zur Extraktion des reinen Pilzmaterials geeignet ist. Das kommerzielle Kit eignet sich gut für die Extraktion pilzlicher DNA aus der Pflanze.

Daher wurden Versuche über eine Nutzung für den frühen Nachweis des Erregers im Feld angestellt. Bei der Untersuchung von Blättern, die latent mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* infiziert waren, konnte der Befall schon 2 Tage nach Inokulation nachgewiesen werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß hierbei generell Oomyceten nachgewiesen werden und nicht ausschließlich *Peronospora farinosa*. Ein weiterer Oomycet, der als Blattpathogen Spinat befallen kann, ist der Weiße Rost (*Albugo occidentalis*). Dieser ist jedoch bislang nur in den USA von Bedeutung (O'BRIEN UND WEBB 1958, BLACK UND DAINELLO 1986, LESKOVAR UND BLACK 1994, CORRELL ET AL. 1994). Weitere Probleme bereitet auch der Probenumfang, wenn man in einem Spinatbestand einen latenten Befall nachweisen möchte.

Eine Problematik bei der Untersuchung von eingeschickten Proben ist die unterschiedliche Form, in der die Proben verschickt werden. Es ist oftmals schwer, das erhaltene Isolat weiterzuvermehrten. Auch die relevanten Vermehrungssorten sind oftmals nicht sofort für den Aufbau einer Pathogenpopulation vorrätig, sondern müssen erst angezogen werden. Bei der Suche nach Vorgehensweisen für eine Probenahme im Feld konnte festgestellt werden, daß einige wenige Blätter mit guter Sporulation zum Verschicken ausreichen, diese können bei –20 oder –80°C gelagert und dann gefroren verschickt werden. Zur Identifizierung ist eine aufwendige Vermehrung nicht mehr notwendig, im schlechtesten Fall muß aber nur noch ein Mal vermehrt werden. Für Probenahmen, die direkt für eine RAPD-PCR verwendet werden, genügt es, einige Befallsstellen in 1ml dest. Wasser abzupinseln. Eine Vereinfachung der Extraktion durch Abpinseln ausschließlich in Lysispuffer hat sich nicht als geeignet erwiesen. Eine Lagerung des Pilzmaterials ist in beiden Fällen bei –20/–80 °C möglich, ohne daß der Gehalt an extrahierbarer DNA abnimmt.

Bei der Untersuchung der vorliegenden Isolate mittels RAPD-PCR konnte zunächst eine hohe genetische Variabilität der Isolate festgestellt werden. Dies ist besonders eindeutig, da

eine Verrechnung über alle 6 verwendeten Primer durchgeführt wurde. Auf dieser hohen Variabilität beruht auch die Fähigkeit des Erregers, relativ rasch neue Rassen ausbilden zu können.

Die vorliegenden Isolate konnten keinem der verwendeten Referenzisolate zugeordnet werden. Problematisch war dabei, daß für diese Untersuchung zu wenige Referenzisolate vorlagen. Gerade die hohe genetische Variabilität des Erregers bedingt, daß zur eindeutigen Rassenzuordnung eine Vielzahl an Referenzisolaten einer Rasse verwendet werden müssen. Erst dann kann eine eindeutige Aussage getroffen werden, ob eine Rassenzuordnung mittels RAPD-PCR möglich ist. Weiterhin kann festgestellt werden, daß mit den verwendeten Primern die einzelnen Genotypen zwar sehr gut voneinander unterschieden werden konnten, jedoch sollte für eine Rassendifferenzierung die Anzahl der getesteten Primer erhöht werden und solche gesucht werden, die eine Zuordnung zu den einzelnen Rassen ermöglichen. Letztlich mag es auch von Vorteil sein, zur Charakterisierung der Isolate und Rassendifferenzierung weitere molekularbiologische Methoden, wie die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) hinzuzuziehen. Diese Methode beruht auf einer selektiven Amplifikation von Restriktionsfragmenten von komplett verdauter DNA (VOS ET AL. 1995). Sie ist gut geeignet, um genetische Variationen bei Pilzen aufzudecken besonders auf der intraspezifischen Ebene innerhalb einer Art, außerdem hat sie gegenüber der RAPD Vorteile in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Auflösungsvermögen (EDEL 1998). Bei *Peronospora parasitica* wurden mit Hilfe dieser AFLP-Untersuchung Isolate von 2 verschiedenen Wirtspflanzen untersucht, und eine eindeutige Gruppierung der Isolate war möglich (REHMANY ET AL. 2000).

Mit der RAPD-Untersuchung unter der Verwendung des Primers 1 konnten zwei Banden ausgemacht werden, die bei allen untersuchten Isolaten und dem Referenzisolat Pf7 ausgeprägt sind. Möglicherweise könnten diese Banden als spezifisch für die Rasse Pf7 gesehen werden. Um dies abzusichern und zu bestätigen, muß allerdings noch eine Vergleichstestung mit weiteren Referenzisolaten der Rasse Pf7 erfolgen, wobei sich die Beschaffung dieser Referenzisolate bei einem obligaten Pathogen wie *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* als schwierig erweist. Eine Bestätigung der spezifischen Banden würde eventuell die Erstellung eines spezifischen Primers für die Rasse Pf7 ermöglichen.

Unter den untersuchten Isolaten befanden sich mehrere von einem Standort aus demselben Jahr (Niedersachsen: BS2, BS3, BS4). Dabei gruppieren sich die Isolate BS2 und BS3 zusammen (50% Homologie), während das Isolat BS4 eine 30%ige Homologie zu diesen Isolaten vom selben Standort aufweist. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß hier im Bestand zwei unterschiedliche Infektionsquellen vorlagen. Die Isolate BS2 und BS3 stammen

vermutlich von der gleichen Infektionsquelle ab (z.B. eingeflogene Spore), während das Isolat BS4 von einer anderen Infektionsquelle stammt. Hier stellt sich dann aber die Frage, wie variabel die Population eines Erregers in einem Spinatfeld ist, und wie rasch sich diese Population z.B. durch Mutationen etc. verändern kann. Erste Hinweise dazu geben die Untersuchungen zur Methodik der RAPD bei *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*, hier wurden die Bandenmuster mehrerer Extraktionen eines Isolates verglichen, dabei zeigten sich die Hauptbanden als reproduzierbar. Dies läßt den Schluß zu, daß keine raschen Veränderung der Population in einem Spinatbestand auftreten und somit zwei Infektionsstartpunkte vorgelegen haben müssen.

Noch deutlicher wird dies bei der Betrachtung von Isolaten eines Standortes, aber aus zwei unterschiedlichen Jahren (G1 und G2). Die Isolate weisen eine sehr geringe Homologie von ca. 15% auf. Vermutlich beruhen die Infektionen hier auf dem Zuflug von Sporangien aus jeweils unterschiedlichen Populationen. Zur Bestätigung all dieser Vermutungen ist allerdings eine weitreichende und umfassende Untersuchung einer Vielzahl von Isolaten von weiteren Standorten und verschiedenen Jahren notwendig.

Mit den vorliegenden RAPD-Untersuchungen zu *Peronospora farinosa* f.sp. *spinaciae* ist zunächst ein Grundstein für weitere molekular-biologische Untersuchungen gelegt worden. Es gilt, die noch offenen Fragen zur Rassendifferenzierung und zur Variabilität des Erregers genauer zu beleuchten. Die für das Prognosemodell für Falschen Mehltau an Spinat angestrebte Aussage zur Rassenverteilung innerhalb Deutschlands konnte gemacht werden. Der zur Zeit ausschließliche Nachweis der Rasse Pf7 schränkt mögliche Resistenzmanagementempfehlungen im Rahmen des Modells ein.

Die vorliegende Arbeit liefert Daten zum Wachstum der Wirtspflanze Spinat, zur Biologie des Erregers unter kontrollierten Bedingungen, zur Epidemiologie des Erregers unter Freilandbedingungen, zur Wirt-Pathogen-Interaktion und zur Rassenverteilung innerhalb Deutschlands. Insgesamt konnte somit eine Datenbasis für ein Prognosemodell für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* geschaffen werden.

Angaben zur Bestandsentwicklung und zum Bestandsklima sind eine Grundvoraussetzung für die Prognose von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. Für Aussagen zur Bestandsentwicklung liegt ein einfaches Wachstumsmodell für Spinat (Submodell Bestandsentwicklung), das im Rahmen des Prognosemodells für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* verwendet werden kann, bereits vor (FINK, 2000 mündliche Mitteilung). Für diese Modellierung der Bestandsentwicklung sind als Eingabedaten für die Anwendung lediglich Angaben zum Aussaattermin und zur angebauten Spinatsorte durch den Anbauer, gekoppelt mit Wetterdaten, notwendig.

Die daraus hervorgehende Beschreibung der Bestandsentwicklung zusammen mit Wetterdaten ermöglichen die Beschreibung des Bestandsklimas (Submodell Bestandsklima). Bei einer Prognose von Falschem Mehltau ist eine Berücksichtigung des Bestandsklimas unerlässlich, da dies entscheidend für das Auftreten und die Ausbreitung des Erregers im Bestand ist. Besonders der Faktor Blattnässedauer im Bestand ist bei der Modellierung des Bestandsklimas von Bedeutung, da die Blattnässedauer entscheidend für Erregerprozesse wie Keimung/Infektion ist. Bei Falschem Mehltau an Salat (*Bremia lactucae*) hat sich bereits die Blattnässedauer, hier besonders in den Morgenstunden, als entscheidend für eine weitere Prognose und Modellierung der Erregerentwicklung erwiesen (SCHERM UND BRUGGEN 1994). Ein Submodell Bestandsklima, in dem die Blattnässedauer berücksichtigt wird, wird also auch bei der Modellierung des Erregergeschehens von *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* als unerlässlich angesehen.

Eine Verknüpfung der Aussage zur Entwicklung des Bestandes und zum Bestandsklima mit den ermittelten Eckdaten zur Erregerreaktion bei verschiedenen Klimabedingungen ermöglichen dann eine Aussage zum Erregergeschehen im Bestand (Submodell Epidemiologie). Als Ausgabewert des Modells kann eine Aussage zur Befallsstärke zu einem konkreten Termin gemacht werden. Dies erlaubt letztendlich eine Abschätzung der Erregerentwicklung und die Terminsetzung von Bekämpfungsmaßnahmen. Eine vergleichbare Vorgehensweise wurde für die Entwicklung eines 2-dimensionalen stochastischen Modells der Epidemie von Falschem Mehltau an Radies (*Peronospora parasitica*) verwendet, wobei dies zu einem Prognosemodell für Falschen Mehltau an Radies ausgeweitet wird (FINK UND KOFOET 2002). Als Möglichkeit der Prognosemodellentwicklung für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* ist die Anpassung dieses Modellansatzes mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Parameter zur Biologie des Erregers denkbar.

Von Bedeutung für den Einsatz des Prognosemodells in der Praxis ist die Modellvalidierung. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit genaue Vorgehensweisen dokumentiert werden, die es ermöglichen, Validierungsdaten des Modells an verschiedenen Standorten zu erheben. So ermöglicht z.B. das dargestellte Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* eine einheitliche Bewertung von Befallsverläufen an verschiedenen Standorten und durch unterschiedliche Personen. Zusätzlich zu den im Freiland unter Praxisbedingungen untersuchten Befallsverläufen sind unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern Daten zu den Entwicklungsprozessen der Biologie des Erregers erhoben worden. Die in den Klimakammern erhobenen Daten zur Biologie stellten sich dabei als geeignet heraus, die unter Freilandbedingungen ablaufenden Prozesse zu interpretieren.



Unter Verwendung der erhobenen Daten zur Erregerbiologie ist das Prognosemodell für Falscher Mehltau an Spinat auf die in Deutschland ausschließlich auftretende Rasse Pf7 ausgerichtet. Bei Auftreten neuer Rassen in Deutschland muß eine Überprüfung der Parameter zur Biologie des Erregers erfolgen.

Letztlich liefert die vorliegende Arbeit Ausblicke auf noch offene Fragen zum System Falscher Mehltau/ Spinat, die sich unabhängig vom Ziel der vorliegenden Arbeit ergeben. Zum einen stellt sich im Bereich Wirt-Pathogen-Interaktion zusätzlich die Frage, wie die Photosynthese wiederum Einfluß auf den Erreger nimmt. Zum anderen sollte im Bereich der molekularbiologischen Untersuchungen zu *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* über eine Untersuchung weiterer Isolate der Rasse Pf7 und über einen Vergleich mit anderen *Peronospora*-Arten gesichert werden, ob die in dieser Arbeit angesprochenen 2 polymorphen Banden, die bei einer RAPD-Untersuchung mit Primer 1 sichtbar werden, als charakteristisch für die Rasse Pf7 zu werten sind. Möglicherweise wären diese dann als molekularer Marker für die Rasse Pf7 denkbar.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen einer umweltfreundlichen und kosteneffektiven Produktion von Gemüse finden Prognosemodelle für diverse Schaderreger Anwendung. Diese Entscheidungshilfen erlauben eine genaue Vorhersage des Erregergeschehens und der damit verbundenen notwendigen Bekämpfungsmaßnahmen. Bestandteil eines Prognosemodells für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*, einer der bedeutendsten Pathogene im Spinatanbau, ist ein Submodell Epidemiologie, welches Aussagen zur Entwicklung des Erregers trifft. Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte die Erstellung und Dokumentation der für das Submodell Epidemiologie erforderlichen Datengrundlage. Die Befallsstärke des Pathogens als Ausgabewert des Submodells Epidemiologie wird von dem Zusammenspiel der Witterung, der Wirtspflanze, des Bestandsklimas, des Pathogens und der Wirt-Pathogen-Interaktion bestimmt. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Prozesse der Biologie des Erregers in Abhängigkeit von verschiedenen Klimafaktoren, die Epidemiologie des Erregers in Freilandbeständen, Fragen zur Wirt-Pathogen-Interaktion und zur Rassenverteilung des Erregers innerhalb Deutschlands eingehender untersucht. Folgende Ergebnisse und Aussagen konnten mit den Untersuchungen zu *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* getroffen werden:

### Datenerhebung Wachstum Spinat:

Die Entwicklung verschiedener Wachstumsparameter der Spinatpflanze wurden in wöchentlichem Abstand bei 10 Sätzen Spinat der Sorte „Ballet“ verfolgt. Es konnte ein gleichbleibender Wachstumsverlauf der Sätze unabhängig von der Tageslänge ausgemacht werden. Mit Hilfe der erhobenen Daten konnte die Beziehung zwischen Entwicklungsstadium und Blattfläche ( $\text{cm}^2/\text{m}^2$ ) dargestellt werden. Auf diese Daten wurde für die Ermittlung der Befallsstärke bei den bonitierten Befallsverläufen zurückgegriffen.

### Untersuchungen zur Biologie des Erregers in Abhängigkeit von Witterungsfaktoren:

Die für Versuche mit Falschem Mehltau an Spinat geeignete Sporangienkonzentration beträgt  $5-10 \times 10^4$  Sporangien/ml.

Keimung/Infektion: Eine optimale Keimung und Infektion wird bei  $10^\circ\text{C}$  erzielt. Die optimale Blattnässeperiode für die Keimung liegt hier bei 8-10 Stunden und für die Infektion bei 12 Stunden.

Sporulation: Bei kleineren Befallsstellen weist der Erreger eine höhere Sporulationsintensität pro Flächeneinheit auf als bei größeren. Bei einer Temperatur von  $15/10^\circ\text{C}$  Tag/Nacht und einer hohen Beleuchtungsstärke werden die meisten Sporangien produziert. Die Sporulationsdauer beträgt bei  $15/10^\circ\text{C}$  (Tag/Nacht) ca. 11 Tage. Bei höheren Temperaturen wie  $15-20^\circ\text{C}$  kann sie nur 6-7 Tage betragen.

**Latenz:** Die kürzeste Latenzdauer von 6 Tagen zeigt sich bei 15/10°C und 20/15°C /Tag/Nacht) und einer Inokulumkonzentration höher als  $10^4$  Sporangien/ml. Bei einer zusätzlichen hohen Beleuchtungsstufe sinkt die Latenzdauer auf 4 Tage.

**Sporangienvitalität:** Bei an den Sporangienträgern haftenden Sporangien bleibt die Keimfähigkeit bei den untersuchten Temperaturen und Beleuchtungsstärken erhalten. Abgelöste Sporangien sind bei den untersuchten Bedingungen maximal 1 Tag keimfähig.

#### Untersuchungen zur Epidemiologie des Erregers unter Freilandbedingungen:

Zunächst konnte, beruhend auf der Gelbfärbung der Blätter bei Befall, ein Boniturschema für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* erstellt werden, welches auch nach Bestandsschluß eine Bonitur ermöglicht und somit nicht sichtbaren Befall im Spinatbestand berücksichtigt. Das Boniturschema ermöglicht eine vergleichbare Bonitur an verschiedenen Standorten und durch unterschiedliche Personen. Insgesamt konnten 7 Befallsverläufe des Falschen Mehltaus in Spinatbeständen genau bonitiert werden. Primärinokulum, Infektions- und Sporulationshäufigkeit und Kulturdauer konnten als Einflußfaktoren auf den Befallsverlauf ausgemacht werden.

#### Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion:

Bei der Untersuchung des Anfälligkeitsverhaltens der Wirtspflanze Spinat in Abhängigkeit vom Alter und Entwicklungsstadium konnte festgestellt werden, dass die Entwicklungsstadien BBCH 102 und 105 die höchste Befallsstärke aufwiesen, ältere Entwicklungsstadien, wie BBCH 107 und 108, zeigten nur geringe Befallswerte. Bei den untersuchten Blattpaaren erwiesen sich die Keimblätter und das erste und zweite Laubblattpaar als am stärksten mit *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* befallen.

Die Untersuchungen zum Einfluß des Erregers auf die Photosynthese und das Wachstum der Wirtspflanze Spinat ergaben, dass es im Befallsverlauf zu keiner abnehmenden Photosyntheserate kommt. Es konnte aber ein Zusammenhang zwischen Erregerbefall und reduziertem Wachstum der Spinatpflanzen festgestellt werden, wobei es zu einer erhöhten Einlagerung von Trockensubstanz in befallenen Spinatblättern kommt.

#### Untersuchungen zur Rassenverteilung innerhalb Deutschlands:

Isolate aus den Regionen Brandenburg, Berlin, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen konnten untersucht werden. In den untersuchten Regionen wurde mittels Testpflanzensortiment die Rasse Pf7 identifiziert. Um ein schnellere und eindeutigerere Identifizierungsmethode zu entwickeln, wurden molekularbiologische Untersuchungen zur Rassenverteilung durchführt. Hierzu wurde die RAPD-Methodik für *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* optimiert, und Vorgehensweisen für die Identifizierung des Erregers im Feld angegeben. Eine Unterscheidung der vorhandenen Rassen mittels RAPD erwies sich als

möglich, gleichzeitig war eine eindeutige Zuordnung der Isolate zu den vorhandenen Referenzisolaten nicht möglich. Bei der Untersuchung der Isolate mit Primer 1 konnten polymorphe Banden ausgemacht werden, die eventuell charakteristisch für die Rasse Pf7 sein könnten.

Schaffung einer Datengrundlage für ein Prognosemodell:

Im Rahmen der Untersuchungen konnte eine Datenbasis (10 untersuchte Sätze über 2 Jahre) für ein Submodell Wachstum Spinat als Teil des Prognosemodells für Falschen Mehltau an Spinat erhoben werden. Die Bonitur von Befallsverläufen (7 untersuchte Sätze über 3 Jahre) liefern eine Datengrundlage für das Submodell Epidemiologie. Ebenfalls wichtig für das Submodell Epidemiologie sind die Untersuchungen zur Parametergewinnung in den Bereichen Keimung/Infektion, Sporulation, Latenz, Sporangienvitalität und Rassenverteilung.

## 7. Summary

Simulation models for a diverse amount of pathogens are being employed as part of an environmentally friendly and cost-effective production of vegetables. The models aid decision making by enabling an exact prediction of pathogen development, epidemic expansion and necessary control measures. Part of a simulation model for downy mildew of spinach (*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*), one of the most important pathogens of spinach, is the Submodel Epidemiology, which allows for an exact description of the pathogen's development. In the course of the present work, an extensive database for the Submodel Epidemiology was compiled. As the final output parameter of the submodel, disease severity is determined by the interaction of weather, host plant, microclimate and pathogen. The present work therefore comprises studies on the biology of the pathogen depending on different climate factors, on the epidemiology of the pathogen under field conditions, on the host-pathogen interaction and on the race distribution of the pathogen throughout Germany. The following results were obtained:

### Dataset: spinach growth

The development of various growth parameters of spinach plants in ten spinach crops (variety „Ballet“) was determined at weekly intervals. It could be shown that the growth development of the spinach crops was constant throughout the year and therefore independent of the length of daylight available. The relationship between development stage and leaf area (cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>) could be described by using the measured datasets. These data were then used for the determination of disease severity after scoring of diseased fields.

### Studies on the biology of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* depending on climate factors

The necessary sporangia concentration for experiments with downy mildew of spinach is 5-10 x10<sup>4</sup> sporangia/ml.

Germination/infection: optimal germination and infection is obtained at 10°C. The optimal leaf wetness duration for germination is 8-10 hours, whereas for infection it is 12 hours.

Sporulation: on smaller lesions the pathogen shows a higher sporulation intensity per defined diseased leaf area than on larger lesions. The highest amount of sporangia are produced at 15/10 °C day/night and a high light intensity. The duration of sporulation at 15/10°C (day/night) can last for 11 days. At high temperatures such as 15-20°C it only lasts for 6-7 days.

Latency: The shortest latency period of six days is obtained at 15/10°C and 20/15 °C (day/night) and with an inoculum concentration higher than 10<sup>4</sup> sporangia/ml. If in addition the light intensity is high then the latency period lasts for only 4 days.

---

Studies on the epidemiology of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* under field conditions

A scoring system for downy mildew was developed based on the yellow discolouring of the leaves. This scoring system allows for an exact scoring after closure of the canopy. The system ensures comparable scoring by different people at different spinach growing sites. In all the development of seven downy mildew epidemics was scored exactly. Primary inoculum, infection-and sporulation intensity and the length of the growing period could be identified as the main influences on disease development.

Studies on host-pathogen interaction

Studies on the susceptibility of spinach towards downy mildew depending on host age and development stage showed that development stages BBCH 102 and 105 had the highest disease severity. Older development stages such as BBCH 107 and 108 only showed low disease severity. Cotyledons, the first and the second leaf pairs are most susceptible towards downy mildew.

Studies on the effect of downy mildew on photosynthesis and growth of the host plant stated that there is no decline in the photosynthesis rate during the course of disease development. There is, however, a connection between disease and reduced growth of the host, as a higher amount of dry matter is accumulated in diseased leaves.

Studies on race distribution throughout Germany

Isolates from Brandenburg, Berlin, Saxony, Saxony-Anhalt, Lower Saxony and Northrhine-Westfalia were analysed. Differentiation with a specific test differential set identified all isolates as race Pf7. To obtain a faster and more definite method of differentiation molecular-biological studies on the race distribution were carried out. RAPD-PCR was optimised for *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* and a process for the identification of the pathogen in the field is described. A differentiation of the available downy mildew races is possible. At the same time a definite classification of the collected isolates according to the reference isolates was not possible. Studies using primer 1 revealed polymorphic bands that may perhaps be characteristic for race Pf7.

Data basis for a simulation model

In the course of the present study a data basis (ten spinach crops in two years) for the Submodel Spinach Growth as part of the simulation model for downy mildew of spinach could be obtained. The scoring of pathogen development (seven spinach crops in three years) is a basis for the Submodel Epidemiology. Furthermore, parameters obtained by studies on germination/infection processes, sporulation processes, latency, viability of sporangia and race distribution are important for the Submodel Epidemiology.

**Anhang****A.1. Statistik**

Trockenmasseentwicklung in Bezug zur Strahlung bei 4 Sätzen Spinat (Jahr 2000)/Trendlinien

Lineare Trendlinie:  $y = a \cdot X + b$

Satz	a	b	R <sup>2</sup>
1	1,51	7,45	0,9639
2	1,87	-12,24	0,9068
3	1,43	-49,08	0,9706
4	1,47	-115,51	0,9015

CO<sub>2</sub>-Gaswechsel/Schale in Abhängigkeit von der Zeit (μmolCO<sub>2</sub>s<sup>-1</sup>): 2-faktorielle ANOVA

Effekt	SQ	FG	MQ	F	p
Konstante	8548,265	1	8548,265	7694,941	0,000000
dpi	112,171	4	28,043	25,243	0,000000
Behandlung	15,447	1	15,447	13,905	0,00387
dpi*Beh.	1,699	4	0,425	0,382	0,820601
Fehler	77,763	70	1,111		

CO<sub>2</sub>-Gaswechsel/Schale (Bezug Blattflächeneinheit)

Zerlegung der Gesamtvarianz für Parallelitäts- und Positionstest der beiden Regressionsgeraden:

	SQ	FG	MQ	F
<i>Gesamt</i>	91,95	39		
<b>Gesamtregression</b>	41,96	1		
<b>Positionsunterschiede</b>	0,71	1	0,71	<b>0,53</b>
<b>Abweichung d. Regressionskoeffizienten</b>	1,25	1	1,25	<b>0,94</b>
<b>Kombinierter Rest</b>	48,02	36	1,33	

Der F-Wert für 1 und 36 Freiheitsgrade bei  $\alpha = 0,05$  beträgt 4,11.

CO<sub>2</sub>-Gaswechsel pro Pflanze in Abhängigkeit vom LAI/ nicht lineare RegressionModell:  $A_1 = b \cdot (1 - \exp(-c \cdot \text{Var}_1))$  Abh. Var: A\_1 (inokuliert)

Konfidenzniveau: 95,0% (alpha= 0,050)

	Schztg.	Standardfehler	t FG=38	p-Niveau	Untere Konfigur.	Obere Konfgr.
<b>b</b>	0,099810	0,016593	6,015182	0,000001	0,066219	0,133401
<b>c</b>	0,372882	0,081304	4,586265	0,000048	0,208291	0,537474

Modell:  $A_0 = b \cdot (1 - \exp(-c \cdot \text{Var}_1))$  Abh. Var: A\_0 (nicht inokuliert)

Konfidenzniveau: 95,0% (alpha= 0,050)

	Schztg.	Standardfehler	t FG=38	p-Niveau	Untere Konfigur.	Obere Konfgr.
<b>b</b>	0,110396	0,015051	7,334960	0,0000000	0,079927	0,140864
<b>c</b>	0,306819	0,062220	4,931176	0,000016	0,180860	0,432777

$$A_0 = 0,1104 \cdot (1 - \exp(-0,31 \cdot \text{LAI}))$$

$$A_1 = 0,0998 \cdot (1 - \exp(-0,37 \cdot \text{LAI}))$$

Lichtnutzungseffizienz in Abhängigkeit von der Zeit (k:0,34)/ 2-faktorielle ANOVA

Effekt	SQ	FG	MQ	F	p
<b>Konstante</b>	63310,14	1	63310,14	31443,80	0,000000
<b>TAG</b>	75,25	4	18,81	9,34	0,000004
<b>INO</b>	0,06	1	0,06	0,03	0,865262
<b>TAG*INO</b>	10,67	4	2,67	1,33	0,269209
<b>Fehler</b>	140,94	70	2,01		



## **A.2. Bewertung der phänologischen Entwicklungsstadien des Spinates anhand der BBCH Skala**

Zur einheitlichen Bewertung der Wachstumsstadien des Spinates wurde die erweiterte BBCH-Skala nach FELLER ET AL. (1995) verwendet. Die Skala ist von Keimung bis Absterben in 9 Makrostadien unterteilt. Bei der Erstellung dieses Berichtes wird ausschließlich auf das Makrostadium 1: Blattentwicklung eingegangen:

100: Keimblätter voll entfaltet; Vegetationspunkt oder Laubblattansatz sichtbar.

101: 1. Laubblatt entfaltet

102: 2. Laubblatt entfaltet

103: 3. Laubblatt entfaltet

10... : fortlaufend

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde nach dem 9. Laubblatt auf Makrostadium 3 und 4 übergegangen. Eine bessere Vergleichbarkeit zwischen allen Boniteuren wurde erreicht, in dem die weiteren Laubblätter gezählt wurden. Dieses erwies sich als ausreichend für die Untersuchungen.

**A.3. Verwendete Reagenzien**

<b>Reagenzien</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Ort</b>
Agarose (DNA electrophoresis analytical grade)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Amplitaq Gold DNA TM inkl. Gene Amp 10x Puffer Polymerase 250 U	PE Applied Biosystems	Weiterstadt
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Bromphenolblau	Whatman biomedizinische GmbH	Biometra Göttingen Analytik
dNTP dGTP, dATP, dTTP, dCTP 40µmol	Promega GmbH	Mannheim
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure)	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie Taufkirchen
Eisessig	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Ethanol 96 %	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie Schnelldorf
Ethidiumbromid (1%)	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Isopropylalkohol ACS REAGENT	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Lactophenolblaulösung	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Lithiumchlorid	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
MgCl <sub>2</sub> Magnesium Chloride Solution 25mM , 25 ml	Promega GmbH	Mannheim
Marker λDNA-Hind III/φX174 DNA-Hae III Mix	Finnzymes	Espoo, Finnland
Natriumchlorid	Whatman biomedizinische GmbH	Biometra Göttingen Analytik
Natriumhypochloridlösung	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
PCR Wasser	Sigma Aldrich GmbH	Chemie Schnelldorf
PCR Puffer (10x)	PE Applied Biosystems	Weiterstadt

---

PEG 6000 (Polyethylenglycol)	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Penecillin g-k-salt, 1580 IU/mg	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Potato-dextrose-agar (PDA)	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Primer Oligonukleotide	Whatman biomedizinische GmbH	Biometra Göttingen Analytik
RNase A	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
SDS	Whatman biomedizinische GmbH	Biometra Göttingen Analytik
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie Taufkirchen
Tetracyclin Hydrochlorid	Merck Eurolab GmbH	Berlin
Tris-Base (Tris-(Hydroxymethyl)- aminomethan)	Sigma-Aldrich GmbH	Chemie Schnelldorf

#### A.4. Herstellung der Puffer für die RAPD Untersuchungen

##### Herstellung der Stammlösungen:

<b>SDS Stammlösung (10% w/v):</b>	10g SDS in 100 ml dest. Wasser
<b>Tris-HCl Stammlösung (1M, pH 8,0):</b>	12,11g Tris-Base mit HCl auf pH 8,0 einstellen; in 100 ml dest. Wasser
<b>EDTA Stammlösung: (0,5M, pH 8,0):</b>	18,61 g EDTA mit NaOH auf pH 8,0 einstellen; in 100 ml dest. Wasser
<b>TBE-Puffer Stammlösung 5x:</b>	54,0 g Tris, 27,5 g H <sub>2</sub> BO <sub>2</sub> Borsäure, 20,0 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) in 1000ml dest. Wasser
<b>TAE-Puffer (50x):</b>	24,2 g Tris, 1,86 g EDTA. Der pH-Wert wird mit Eisessig (96%) auf 7,8 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der Puffer um 1:50 (v/v) mit H <sub>2</sub> O dest. verdünnt

##### Herstellung der Puffer:

<b>Lysispuffer (1% SDS, 10mM EDTA):</b>	10 ml SDS Stammlösung, 2 ml EDTA- Stammlösung in 100 ml dest. Wasser
<b>TE-Puffer:</b>	1 ml Tris-HCl Stammlösung (1M, pH 8,0), 0,2 ml EDTA Stammlösung (0,5M, pH8,0) in 100 ml dest. Wasser
<b>TBE-Puffer Elektrophorese 0,5%:</b>	100 ml TBE Puffer Stammlösung 5x, 900 ml dest. Wasser
<b>Beladungspuffer (10x):</b>	9,3 g EDTA, 40 g Saccharose, 0,25 g Bromphenolblau. Mit TAE –Puffer auf 100 ml auffüllen. Bei Gebrauch Verdünnung um 1:100 (v/v) mit sterilem H <sub>2</sub> O bidest.

Tris: Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan

EDTA: Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure

### **A.5. Herstellung des Agars für die Keimfähigkeitsuntersuchungen**

38g PDA(potato dextrose agar) auf 1 Liter dest. Wasser

Antibiotika:

Penicillin:	0,1g
Chlortetracyclin:	0,01g
Streptomycinsulfat:	0,05g

## A.6. Boniturschema Falscher Mehltau an Spinat:



gesund



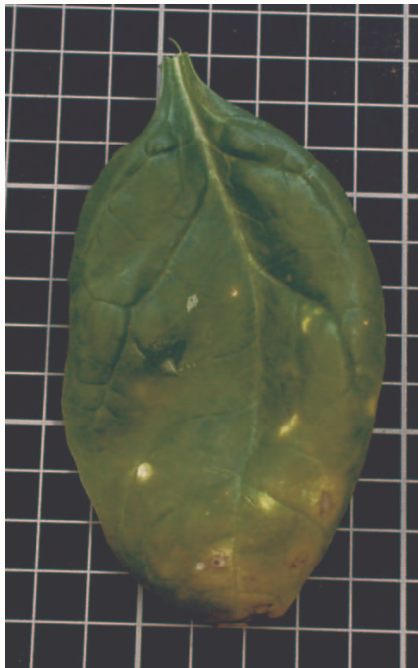
0,1%

## Erläuterungen

- 0,1% :** ein bis wenige punktartige helle Befallsstellen
- 1% :** mehrere schon größere helle Befallsstellen
- 3% :** mehrere Befallsstellen, um diese Flecken einsetzende Gelbfärbung
- 10% :** Gelbfärbung der Flecke fließt ineinander
- 30% :** große Teile der Blattfläche sind erhellt
- 60% :** fast das gesamte Blatt ist gelb verfärbt
- 100% :** Blatt komplett gelb und chlorotisch, nekrotische Abschnitte



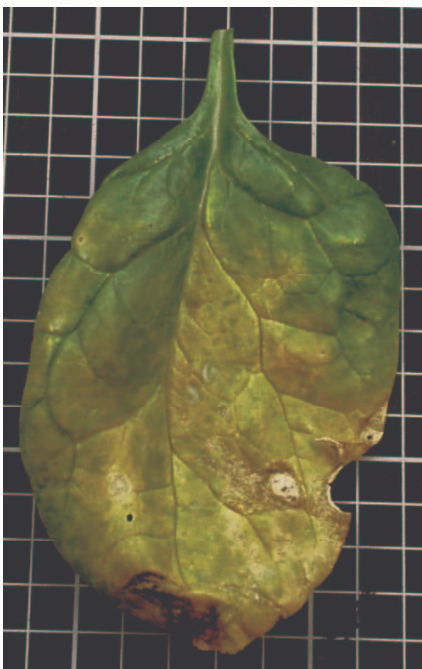
3%



10%



30%



60%



100%

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Submodells Epidemiologie.....	3
Abbildung 2: Entwicklung der Blattfläche ( $\text{m}^2/\text{m}^2$ ) bei 5 Sätzen Spinat (Jahr 2000); Balken: Standardabweichung; s: StandardabweichungTag 202 .....	45
Abbildung 3: Trockenmasseentwicklung (g) in Bezug zur Strahlung ( $\text{W}/\text{m}^2$ ) bei 4 Sätzen Spinat (Jahr 2000); TM/g: Trockenmasse in Gramm; TM $\text{W}/\text{m}^2$ : Tagesmittel der Strahlung .....	47
Abbildung 4: Mittelwert der Blattfläche ( $\text{cm}^2/\text{m}^2$ ) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium; Balken: Standardabweichung .....	48
Abbildung 5: Zusammenhang zwischen der Oberflächenbonitur (OFB) und dem Mittelwert der Einzelpflanzen (% befallene Blattfläche) der untersuchten Pflanzenstichproben; Korrelation ab dem 3. Blatt .....	50
Abbildung 6: Befallene Blattfläche in Abhängigkeit von der Inokulumdichte; LSD-Test ( $\alpha = 0,05$ ); Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Inokulumkonzentrationen.....	52
Abbildung 7: Keimrate in Abhängigkeit von der Temperatur; ( $\alpha=0,05$ ); *: signifikanter Unterschied der Zeitstufen bei einer Temperaturstufe; Kleinbuchstaben: Unterschiede zwischen den Temperaturstufen nach 24h; Großbuchstaben: Unterschiede zwischen den Temperaturstufen nach 48h .....	54
Abbildung 8: Breakpoint-Regressionsanalyse: Keimrate in Abhängigkeit von der Blattnässedauer und der Temperatur .....	55
Abbildung 9: Breakpoint-Regressionsanalyse: Befallene Blattfläche (%) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer .....	57
Abbildung 10: Befallshäufigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur; $10^5$ Sp./ml (LSD Test; $\alpha = 0,05$ ). Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten; Großbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Boniturterminen.....	58
Abbildung 11: Sporulationshäufigkeit (%) in Abhängigkeit von der Temperatur, $10^5$ Sp./ml; ( $\alpha = 0,05$ ; LSD-Test); Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Meßterminen einer Temperaturstufe.....	59
Abbildung 12: Befallene Blattfläche (%) in Abh. v. d. Temperatur ( $\alpha = 0,05$ ; LSD-Test); Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten.....	60
Abbildung 13: Befalls- und Sporulationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (LSD Test $\alpha = 0,05$ ); Temperatur $15/10^\circ\text{C}$ . Keinbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Befallshäufigkeiten; Großbuchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Sporulationshäufigkeiten.....	61
Abbildung 14: Befallene Blattfläche ( $\text{cm}^2$ ) in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (10dpi) (LSD Test; $\alpha=0,05$ ). Kleinbuchstaben Signifikanzen zwischen den Beleuchtungsstufen .....	61
Abbildung 15: Relative Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Befallsstärke und der Zeit; (Bezug 1%;LSD Test $\alpha = 0,05$ ). Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Varianten zu den Meßterminen 5,8 und 11 dpi; Großbuchstaben: Signifikanzen der unterschiedliche Befallsstärken .....	62
Abbildung 16: Relative Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Zeit und der Befallsstärke (Bezug 1% bef. Blattfläche; täglich optimale Sporulationsbedingungen) Balken: Standardabweichung.....	63



Abbildung 17: Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke ( $\alpha=0,05$ ; LSD Test; Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Varianten); Bezug 30% befallene Blattfläche..	64
Abbildung 18: Sporulationsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur (BK 6; Bezug 1%); LSD-Test; $\alpha=0,05$ ). Buchstaben: signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturvarianten .....	65
Abbildung 19: nichtlineare Regression: Vitalität der Sporangien am Sporangienträger in Abhängigkeit von der Temperatur .....	66
Abbildung 20: Vitalität der Sporangien abgelöst vom Sporangienträger in Abhängigkeit von der Temperatur (Keimfähigkeit (%)).....	67
Abbildung 21: nichtlineare Regression: Vitalität der am Blatt haftenden Sporangien in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke. ....	68
Abbildung 22: Vitalität der vom Blatt abgelösten Sporangien in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke (Keimfähigkeit (%)).....	69
Abbildung 23: Befallsverläufe von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> .....	70
Abbildung 24: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (schwacher Endbefall) .....	73
Abbildung 25: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (starker Endbefall).....	73
Abbildung 26: Anzahl Nächte mit einer relativen Feuchte > 95% mit Tagesmitteltemperatur (°C) ab Inokulation bis Ernte (unterschiedliche Kulturdauer).....	74
Abbildung 27: Räumliche Darstellung der Entwicklung von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> im Bestand; Frühjahr 2000 (Oberflächenboniturwert; 1-4 Wochen nach Inokulation) .....	76
Abbildung 28: Räumliche Darstellung der Entwicklung von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> im Bestand ; Herbst 2000 (Oberflächenboniturwert; 1-4 Wochen nach Inokulation) .....	77
Abbildung 29: Befallene Blattfläche (%) in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Entwicklungsstadium (LSD-Test; $\alpha=0,05$ ). Großbuchstaben: Signifikanzen zwischen Temperaturvarianten innerhalb eines Entwicklungsstadiums; Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Entwicklungsstadien und innerhalb einer Temperaturstufe. ....	79
Abbildung 30: Befallene Blattfläche (%) pro entwickeltes Laubblattpaar in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium (Temperaturvariante 15/10 °C). $\alpha=0,05$ , LSD Test. Kleinbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Blattpaaren KB-LB2; Großbuchstaben: Signifikanzen zwischen den Entwicklungsstadien.....	79
Abbildung 31: Mittelwert der täglichen Bestrahlung (PAR) in den Anzuchtkabinen (mol/ m).....	80
Abbildung 32: Entwicklung des Blattflächenindex (Mittelwert pro Schale). Kleinbuchstaben: Varianten unterscheiden sich signifikant; LSD-Test, $\alpha=0,05$ ; krit. Wert Behandlung: 0,062.....	82
Abbildung 33: Frischmasseentwicklung der Laubblätter in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert g/Schale). LSD-Test; $\alpha=0,05$ . Kleinbuchstaben: Varianten unterscheiden sich signifikant; krit. Wert Behandlung: 6,8.....	83
Abbildung 34: Frischmasseentwicklung der Wurzel in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwert g/Schale). LSD-Test; $\alpha=0,05$ ; krit. Wert Behandlung: 0,29.....	83
Abbildung 35: Trockenmassegehalte in Abhängigkeit von der Zeit; (LSD; $\alpha=0,05$ ) krit. Wert Behandlung:0,0024; Kleinbuchstaben: signifikante Unterschiede .....	84

Abbildung 36; CO <sub>2</sub> -Gaswechsel/Schale in Abhängigkeit von der Zeit (µmolCO <sub>2</sub> s <sup>-1</sup> ). LSD-Test α=0,05. Buchstaben: Signifikanzen zwischen den Behandlungen und den Meßterminen; krit. Wert Behandlung: 0,47.....	85
Abbildung 37: CO <sub>2</sub> Gaswechsel/Schale (Bezug Blattflächeneinheit) (µmolCO <sub>2</sub> s <sup>-1</sup> ).....	85
Abbildung 38: Quotient aus mmolCO <sub>2</sub> /mol PAR. Extinktionskoeffizient 0,34). Buchstaben: Signifikanzen zwischen den Meßzeitpunkten; LSD Test, α=0,05.....	87
Abbildung 39: RAPD-Bandenmuster: Vergleich Klimakammer/Gewächshaus Primer 4-6.....	90
Abbildung 40: RAPD-Bandenmuster: unterschiedliche Varianten zur Vorbereitung der DNA für die Extraktion (mit Vorkeimen); Primer 6.....	91
Abbildung 41: RAPD-Bandenmuster: Extraktion mit dem EZNA Fungal Mini Kit .....	92
Abbildung 42: RAPD-Bandenmuster: Vergleich Extraktion nach Hering (1997) (H)/ EZNA Fungal Mini Kit (K) .....	92
Abbildung 43: RAPD-Bandenmuster: Nachweis der Doppelbande in pilzliche und pflanzliche Bande.....	93
Abbildung 44: RAPD-Bandenmuster: Verdünnungsreihe der zwei Extraktionsmethoden .....	93
Abbildung 45: RAPD-Bandenmuster: Extraktion pilzlicher DNA mit und ohne RNA-Verdau (Primer1-6).....	94
Abbildung 46: RAPD-Bandenmuster: Optimale DNA Konzentration für die PCR.....	95
Abbildung 47: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 200µM; MgCl <sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2 .....	96
Abbildung 48: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 400µM; MgCl <sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2 .....	96
Abbildung 49: RAPD-Bandenmuster: PCR-Bedingungen: dNTP 600µM; MgCl <sub>2</sub> 1,5/2,0/3,0; Primer 1 & 2 .....	96
Abbildung 50: Nachweis von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> in der Pflanze .....	97
Abbildung 51: RAPD-Bandenmuster: Vereinfachung der Extraktion von <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> .....	99
Abbildung 52: Lagerung des befallenen Pflanzenmaterials (Beispiel Primer 4) .....	100
Abbildung 53: Einfluß von Lagerungsdauer und Temperatur auf den Gehalt an extrahierbarer DNA; (LSD –Test; α= 0,05). Buchstaben: signifikante Unterschiede. Balken: notwendige DNA- Konzentration für die RAPD-PCR.....	101
Abbildung 54: Rassenunterscheidung Primer1.....	101
Abbildung 55: Unterscheidung der Rassen (Verrechnung aller 6 untersuchten Primer).....	102
Abbildung 56: Dendrogrammdarstellung der untersuchten Isolate (Verrechnung der 6 verwendeten Primer) ..	102
Abbildung 57: Dendrogrammdarstellung der untersuchten Isolate (Primer 1) .....	103

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwicklungsstadium der Versuchspflanzen zur Inokulation.....	31
Tabelle 2: Kenndaten der untersuchten <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> - Isolate .....	34
Tabelle 3: Testpflanzensortiment für <i>Peronospora farinosa</i> f. sp. <i>spinaciae</i> und ihre Resistenzeigenschaften ...	35
Tabelle 4. Reaktionsmix für den Vergleich extrahierter DNA-Mengen.....	39
Tabelle 5: Verwendete Primer .....	40
Tabelle 6: Optimierung der PCR-Bedingungen.....	41
Tabelle 7. Erntetermin und Schosstermin bei 5 Sätzen Spinat .....	46
Tabelle 8: Ermittlung der durchschnittlichen Blattfläche pro Blatt .....	49
Tabelle 9: Latenzperiode (d) in Abhängigkeit von der Temperatur und der Inokulumkonzentration .....	53
Tabelle 10 Parameterschätzung breakpoint Regressionsanalyse; Keimfähigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer.....	55
Tabelle 11: breakpoint Regressionsanalyse: Befallene Blattfläche in Abhängigkeit von der Temperatur und der Blattnässedauer.....	56
Tabelle 12: Parameter der Regressionsgleichungen für die Abhängigkeit der Keimrate von der Temperatur .....	66
Tabelle 13: Parameterschätzung nicht lineare Regression Keimfähigkeit abgelöst vom Blatt in Abhängigkeit von der Bestrahlung.....	68
Tabelle 14: Erstbefallswert (% befallene Blattfläche).....	71
Tabelle 15: Tagesmitteltemperatur (°C) im Bestand zur Inokulation der untersuchten 7 Spinatsätze .....	72
Tabelle 16: Anteil der befallenen Blattfläche (%) in den untersuchten Aussaatschalen.....	81
Tabelle 17: nicht lineare Regression: CO <sub>2</sub> Gaswechsel pro Flächeneinheit .....	86
Tabelle 18: Befallsreaktion des isolates GB1 auf dem Testpflanzensortiment für <i>Peronospora farinosa</i> f.sp. <i>spinaciae</i> .....	88
Tabelle 19: Ergebnisse der Isolatprüfung mit dem Testpflanzensortiment für Falschen Mehltau an Spinat .....	89
Tabelle 20: Nachweisgrenzen der zwei Extraktionsmethoden.....	94
Tabelle 21: Sporangienkonzentration einiger definierter Befallsstellen.....	98

---

## Literaturverzeichnis

- Achar, P. N. (1998):** Effects of temperature on germination of *Peronospora parasitica* conidia and infection of *Brassica oleracea*.  
*Journal of Phytopathology*, **146**: 137-141
- Alexopoulos, C. J., Mims, S. W., Blackwell, M. (1996):** Introductory Mycology.  
Wiley, New York, 868 pp
- Annamalai, P., Ishii, H., Lalithakumari, D., Revathi, R. (1995):** Polymerase chain reaction and its applications in fungal disease diagnostics.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **102**: 91-104
- Anon. (1999):** Spinat: neue Mehltaurassen.  
*Monatsschrift: Magazin für den Gartenbau-Profi, Germany*, **87**: 711
- Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M. P., Geiger, J.-P. (1994):** Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis.  
*Phytopathology*, **84**: 622-626
- Aylor, D. E. (1999):** Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: relationship to integrated pest management strategies.  
*Agricultural and Forest Meteorology*, **97**: 275-292
- Aylor, D. E., Taylor, G. S. (1983):** Escape of *Peronospora tabacina* spores from a field of diseased tobacco plants.  
*Phytopathology*, **73**: 525-529
- Aylor, D. E., Sanogo, S. (1997):** Germinability of *Venturia inaequalis* conidia exposed to sunlight.  
*Phytopathology*, **87**: 628-633
- Ayres, P. G. (1981):** Carbon dioxide exchanges in plants infected by obligately biotrophic pathogens.  
In: Marcelle, R., Clysters, H., Van Pouke, M. (Hrsg.): Photosynthesis and Plant Development, Dr W. Junk, The Hague, 343-354
- Ayres, P.G. (1979):** Effects of disease on the physiology of the growing plant.  
Cambridge University Press, Cambridge, 240 pp
- Bashi, E., Aylor, D. E. (1983):** Survival of detached sporangia of *Peronospora destructor* and *Peronospora tabacina*.  
*Phytopathology*, **73**: 1135-1139
- Bedlan, G. (1987):** Der Falsche Mehltau des Spinates.  
*Pflanzenschutz (Vienna)*, **3/4**:6

- Behr, H. C. (2002):** ZMP Marktbilanz Gemüse.  
ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle GmbH, Bonn, 250 pp
- Beschreibende Sortenliste (1997):** Fruchtgemüse, Blattgemüse.  
Bundessortenamt (Hrsg.), Landbuch Verlag, Hannover
- Black, M. C., Dainello, F. J. (1986):** Comparison of percent leaf area with white rust lesions and two other methods for evaluating partial resistance to *Albugo occidentalis* in spinach.  
*Phytopathology*, **76**: 1087
- Blaeser, M., Weltzien, H. C. (1979):** Epidemiologische Studien an *Plasmopara viticola* zur Verbesserung der Spritzterminbestimmung.  
Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, **86**: 489-498
- Boote, K. J., Jones, J. W., Mishoe, J. W., Berger, R. D. (1983):** Coupling pests to crop Growth simulators to predict yield reductions.  
*Phytopathology*, **73**: 1581-1587
- Brandenberger, L. P., Correll, J. C., Morelock, T. E. (1991):** Identification of and cultivar reactions to a new race (race 4) of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* on spinach in the United States.  
*Plant Disease*, **75**: 630-634
- Brem S., Rast, D. M., Ruffner, H. P. (1986):** Partitioning of photosynthate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* or *Plasmopara viticola*.  
*Physiological and Molecular Plant Pathology*, **29**: 285-291
- Browder, L. E., Lyon, F. L., Eversmeyer, M. G. (1980):** Races, pathogenicity phenotypes and type cultures of plant pathogens.  
*Phytopathology*, **70**: 581-583
- Byford, W. J. (1967):** Host specialization of *Peronospora farinosa* on Beta, Spinacia and Chenopodium.  
*Transcripts of the British Mycological Society*, **50**: 603-607
- Campbell, C. L., Madden, L. V. (1990):** Introduction to Plant Disease Epidemiology.  
John Wiley and Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 532 pp
- Campbell, C. L. (1999):** The importance of dispersal mechanisms in the epidemiology of *Phytophthora* blights and downy mildews on crop plants.  
*Ecosystem Health*, **5**: 146-157
- Chtioui, Y., Francl, L. J., Panigrahi, S. (1999):** Moisture prediction from simple micrometeorological data.  
*Phytopathology*, **89**: 668-672
- Clayton, E. E., Gaines, J. G. (1945):** Temperature in relation to development and control of blue mold (*Peronospora tabacina*) of tobacco.  
*Journal of Agricultural Research*, **71**: 171-182

- Cohen, Y., Rotem, J. (1969):** The effects of lesion development, air temperature and duration of moist periods on sporulation of *Pseudoperonospora cubensis* in cucumbers.  
*Israel Journal of Botany*, **18**: 135-140
- Cohen, Y. (1976):** Interacting effects of light and temperature on sporulation of *Peronospora tabacina* on tobacco leaves.  
*Australian Journal of Biological Science*, **29**: 281-289
- Collinge, D. B., Slusarenko, A. J. (1987):** Plant gene expression in response to pathogens.  
*Plant Molecular Biology*, **9**: 389-410
- Constantinescu, O. (1991):** An annotated list of *Peronospora* names.  
*Thunbergia*, **15**: 1-110
- Cook, H. T. (1933):** Infection of seed clusters of spinach by *Peronospora effusa*.  
*Phytopathology*, **23**: 7
- Cook, H. T. (1936):** Cross inoculation and morphological studies on the *Peronospora* species occurring on *Chenopodium album* and *Spinacia oleracea*.  
*Phytopathology* **26**: 89-90
- Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. (1997):** Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat.  
*Mycological Research*, **101**: 667-677
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M. (2000):** A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes.  
*Fungal Genetics and Biology*, **30**:17-32
- Correll, J. C., Koike, S. T., Brandenberger, L. P., Black, M. C., Morelock, T. E.(1990):** A new race of downy mildew threatens spinach.  
*California Agriculture*, **44**: 14-15
- Correll, J. C., Morelock, T. E., Brandenberger, L. P., Koike, S. T., Dainello F. J. (1994):** Economically important diseases of spinach.  
*Plant Disease*, **78**: 653-660
- Correll, J. C., Koike, S. T., Schafer, J., Anders, J. M., Irish, B. M., Morelock, T. E. (1998):** Two new races of the downy mildew pathogen (*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*) of spinach in the United States.  
*Phytopathology*, **88**: S19
- Correll, J. C., Irish, B. M., Koike, S. T., Morelock, T. E. (2000):** Quantitative resistance to race 6 of the downy mildew pathogen (*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*) of spinach.  
*Phytopathology*, **90**: 16

- Correll, J. C., Irish, B. M., Koike, S. T., Schafer, J., Morelock, T. E. (2003):** Update on downy mildew and white rust on spinach in the United States  
Eucarpia Leafy Vegetables 2003, Th.J.L. van Hintum, A. Lebeda, D. Pink, J.W. Schut (Hrsg.)  
www.leafyvegetables.nl
- Crüger, G., Backhaus, G.-F., Hommes, M., Smolka, S., Vetten, H.-J. (2002):**  
Pflanzenschutz im Gemüsebau  
4. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 318 pp
- Cruickshank, I. A. M. (1963):** Effect of environment on sporulation, dispersal, longevity and germination of conidia of *Peronospora hyoscyami*.  
In: McKeen, W. E. (Hrsg.), Blue Mold of Tobacco, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA, 288 pp
- Crute, I. R. (1981):** The host specificity of peronosporaceous fungi and the genetics of the relationship between host and parasite.  
In: Spencer, D. W. (Hrsg.), The downy mildews.  
Academic Press, London, New York, San Francisco, 237-251
- Dahl-Jensen, B. (1996):** Resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cole crops (*Brassica oleracea*).  
Ph. D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 155 pp
- Dainello, F. J. (1984):** Continuous hours of leaf wetness as a parameter for scheduling fungicide applications to control white rust in spinach.  
*Plant Disease* **68**:1069-1072
- Delye, C., Corio-Costet, M.-F., Laigret, F. (1995):** A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium.  
*Experimental Mycology*, **19**: 234-237
- De Weille, G. A. (1963):** An analysis of the variability of the germinative power of conidia in a number of fungi belonging to the *Peronosporales*.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **69**: 115-131
- De Visser, C. L. M. (1998):** Development of a downy mildew advisory model based on downcast.  
*European Journal of Plant Pathology*, **104**: 933-943
- Dickinson, C. H., Crute, I. R. (1974):** The influence of seedling age and development on the infection of lettuce by *Bremia lactucae*.  
*Annals of Applied Biology*, **76**: 49-61
- Dickson, M. H., Petzoldt, R. (1993):** Plant age and isolate source affect expression of downy mildew resistance in broccoli.  
*HortScience*, **28**: 730-731
- Dyer, A. T., Leonard, K. J. (2000):** Contamination, error, and non-specific molecular tools.  
*Phytopathology*, **90**: 565-567

- Edel, V. (1998):** Use of PCR and RFLP in fungal systematics.  
In: Frisvad, J. C., Bridge, P. D., Arora, D. K. (Hrsg.), Chemical Fungal Taxonomy, Marcel Dekker Inc, 1-20
- Eenink, A. H. (1976):** Linkage in *Spinacea oleracea* L. of two race-specific genes for resistance to downy mildew *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* Byford.  
*Euphytica*, **25**: 713-715
- Elstner, E. F., Oßwald, W., Schneider, I. (1996):** Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen.  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 328 pp
- FAO (2002):** [www.fao.org/](http://www.fao.org/) statistical databases/ FAOSTATAGRICULTUREDATA:  
<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>
- Feller, C., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Heß, M., Klose, R., Meier, U., Stauß, R., van den Boom, T., Weber, E. (1995):** Phänologische Entwicklungsstadien von Gemüsepflanzen, I. Zwiebel-, Wurzel-, Knollen- und Blattgemüse.  
*Sonderdruck aus Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, **47**: 193-206
- Fink, M., Kofoet, A. (2002):** Ein 2-dimensionales stochastisches Modell der Epidemie von Falschem Mehltau an Radies.  
Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, **390**: 225
- Fischer, C., Porta-Puglia, A., Barz, W. (1995):** RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*.  
*Journal of Phytopathology*, **143**: 601-607
- Förster, H., Coffey, M. D. (1990):** Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution  
*Mycologia*, **82**: 306-312
- Foster, L. B., Kozak, K. R., Loftus, M. G., Stevens, J. J., Ross, I. K. (1993):** The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi.  
*Mycological Research*, **97**: 769-781
- Frinking, H. D., Harrewijn, J. L., Geerds, C. F. (1985):** Factors governing oospore production by *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* in cotyledons of spinach.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **91**: 215-223
- Frinking, H. D., Geerds, C. F., Meerman, F. (1981):** Germination of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* conidia: a two-topped temperature curve.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **87**: 163-165
- Frinking, H. D., Linders, E. G. A. (1986):** Three-dimensional representation of downy mildew development in a spinach crop.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **92**: 107-113



- Frinking, H. D., Linders, E. G. A. (1986):** A comparison of two pathosystems: downy mildew on *Spinacia oleracea* and on *Chenopodium album*.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **92**: 97-106
- Frinking, H. D., van der Stoel, M. C. (1987):** Production of conidia by *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*.  
*Netherlands Journal of Plant Pathology*, **93**: 189-194
- Garg, I. D., Mandahar, C. L. (1975, publ. 1976):** Effect of downy mildew on respiration, photosynthesis and carbohydrate synthesis in pearl millet leaves.  
*Indian Phytopathology*, **28**: 565-566
- Gherardi, I., Brunelli, A., Bugiani R. (1999):** A negative prognosis model for primary infections of *Plasmopara viticola*.  
*Frustula Entomologica*, **22**: 87-91
- Goller, S. P., Gorfer, M., Mach, R. L., Kubicek, C. P. (1998):** Gene cloning using PCR.  
In: Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., Elander, R. P. (Hrsg.), Applications of PCR in Mycology, CAB International, New York, Wallingford, 21-45
- Goodwin, P. H., Annis, S. L. (1991):** Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Laepatosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2482-2486
- Grajal-Martin, M. J., Simon, C. J., Muehlbauer, F. J. (1993):** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*.  
*Phytopathology*, **83**: 612-617
- Grevsen, K., Kaack, K. (1996):** Quality attributes and morphological characteristics of spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivars for industrial processing.  
*Journal of Vegetable Crop Production*, **2(2)**, 15-29
- Grote, D., Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J.J., Bertolini, E., Cambra, M. (2002):** Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple- and nested- PCR.  
*European Journal of Plant Pathology*, **108**: 197-207
- Giuntoli, A., Orlandini, S. (2000):** Effects of downy mildew on photosynthesis of grapevine leaves.  
*Proc. of the V Int. Symp. on Grapevine Physiology/ Acta Horticulturae*, **526**: 461-466
- Guthrie, P. A. I., Magill, C. W., Frederiksen, R. A., Odvody, G. N. (1992):** Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*.  
*Phytopathology*, **82**: 832-834
- Gutsche, V. (1996):** Die Modellmethode im Pflanzenschutz.  
*Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin- Dahlem*, **321**: 324

- Habeshaw, D. (1984):** Effects of pathogens on photosynthesis  
In: Wood, R. K. S. and Jellis, G. J.(Hrsg.): Plant diseases: infection, damage and loss, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 63-72
- Handke, S., Seehaus, H., Radies, M. (2000):** Nachweis einer Kopplung der vier dominanten Resistenzgene „M1M2M3M4“ gegen den Falschen Mehltau bei Spinat aus der Wildform *Spinacia turkestanica*.  
*Gartenbauwissenschaft*, **2/2000**: 73-78
- Harbrecht, E., Lattauschke, E. (1999):** *Peronospora farinosa* –ein Pilz der nur schwer zu fassen ist.  
Infodienst Gartenbau, 11/99; Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Dresden
- Hartmann, H., Sutton, J. C., Proctor, R. (1983):** Effects of atmospheric water potentials, free water, and temperature on production and germination of sporangia in *Peronospora parasitica*.  
*Canadian Journal of Phytopathology*, **5**: 70-74
- Hau, B. (1995):** Entwicklung von Simulationsmodellen von Pflanzenkrankheiten.  
*Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin- Dahlem*, **311**: 36-44
- Hau, B., Kranz, J. (1989):** Fehler beim Schätzen von Befallsstärken bei Pflanzenkrankheiten.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **96**: 649-674
- Hausladen, H., Habermeyer, J.(2000):** Gezielter Pflanzenschutz im Kartoffelanbau mit dem PhytophthoraModell Weihenstephan.  
*Gesunde Pflanzen*, **52**: 221-227
- Heißner (1997):** Technische Parameter und Anwendung eines CO<sub>2</sub>-Gaswechselmeßsystems für Untersuchungen an Einzelpflanzen.  
Jahresbericht 1997 Institut für Gemüse-und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.; Institut für Gemüse-und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. (Hrsg.), BKB-Verlag, Berlin
- Henson, J. M., French, R. (1993):** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis.  
*Annual Review of Phytopathology*, **31**: 81-109
- Hering, O. (1997):** Charakterisierung und Differenzierung bei *Fusarium* Link mittels RAPD und ITS-RFLP.  
*Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin- Dahlem*, **331**
- Hildebrand, P. D., Sutton, J. C. (1984):** Relationships of temperature, moisture, and inoculum density to the infection cycle of *Peronospora destructor*.  
*Canadian Journal of Plant Pathology*, **6**: 127-134
- Hildebrand, P. D., Sutton, J. C. (1984):** Effects of water variables on spore survival and infection of onion leaves by *Peronospora destructor*.  
*Canadian Journal of Plant Pathology*, **6**: 119-126

- Hindorf, H. (1997):** Introducing decision support systems available in Germany.  
In: Dehne, H.-W., Adam, G., Diekmann, M., Frahm, J., Mauler-Machnik, A., van Halteren, P., Proceedings of the 4<sup>th</sup> Symposium of the European Foundation for Plant Pathology, Sept 9-12, 1996, Bonn, Germany: Diagnosis and Identification of Plant Pathogens, Developments in Plant Pathology Volume 11, Kluwer Academic Press, Dordrecht, Boston, London, 267-270
- Hoffmann, G. M., Nienhaus, F., Poehling, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C., Wilbert, H.: (1994):** Lehrbuch der Phytomedizin.  
3. Auflage, Blackwell Wissenschaft, Berlin, 542 pp
- Inaba, T. (1985):** Seed transmission of downy mildew of spinach and soybean.  
*JARQ*, **19**: 27-31
- Inaba, T., Morinaka, T. (1984):** Heterothallism in *Peronospora effusa*  
*Phytopathology*, **74**: 214-216
- Inaba, T., Morinaka, T. (1985):** The relationship between conidium and oospore production in spinach leaves infected with *Peronospora effusa* ( Grev. ex Desm.) Ces.  
*Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **51**: 443-449
- Ingram, D. S. (1981):** Physiology and biochemistry of host-parasite interaction  
In: Spencer, D. W. (Hrsg.), The downy mildews.  
Academic Press, London, New York, San Francisco, 143-163
- James, W. C. (1974):** Assessment of plant diseases and losses.  
*Annual Review of Phytopathology*, **12**: 27-48
- Jones, H. A., McLean, D. M., Perry, B. A. (1956):** Breeding hybrid spinach to resistant to mosaic and downy mildew.  
*American Society for Horticultural Science*, **68**: 304-308
- Jones, R. K., Dainello, F. J. (1982):** Occurrence of race 3 of *Peronospora effusa* on spinach in Texas and identification of sources of resistance.  
*Plant Disease*, **66**: 1078-1079
- Kamoun, S., Huitema, E., Vleeshouwers, V. G. A. A. (1999):** Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response.  
*Trends in Plant Science*, **4**: 196-200
- Kaul, K., Shaner, G. (1989):** Effect of temperature on adult-plant resistance to leaf rust in wheat.  
*Phytopathology*, **79**: 391-394
- Kleinhenz, B., Jörg, E. (1998):** Integrierter Pflanzenschutz- Rechnergestützte Entscheidungshilfen.  
*Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 473*

- Kluczewski, S. M., Lucas, J. A., McNaughton, I. M. (1980):** Resistance of Raphanobrassica seedlings to downy mildew, *Peronospora parasitica*.  
*Cruciferae Newsletter*, **5**: 39-41
- Kofoet, A. (1988):** Untersuchungen zur Wirt-Parasit-Beziehung von *Allium* sp. und *Peronospora destructor* (Berk.) casp., als phytopathologische Grundlage der resistenzbeurteilung von Zwiebeln (*Allium cepa* L.).  
Dissertation, TU-München
- Kranz, J. (1977):** A study on the maximum severity in plant diseases.  
*Travaux dedies aG. Viennat-Bourgén*, 33-62
- Kremheller, H. Th.; Diercks, R. (1983):** Epidemiologie und Prognose des Falschen Mehltaus (*Peudoperonospora humuli*) an Hopfen.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **90**: 599-616
- Kröber, H. (1981):** Keimverhalten und Lebensdauer unter verschiedenartigen Bedingungen aufbewahrter Konidien mehrerer Peronosporaceen.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **88**: 510-517
- Kröber, H. (1970):** Die Lebensdauer der Konidien einiger *Peronospora*-Arten unter verschiedenen Umweltverhältnissen.  
*Phytopathologische Zeitschrift*, **69**: 64-70
- Kröber, H., Özel, M., Petzold, H. (1979):** Wirt-Parasit-Verhalten bei mehreren kompatiblen und inkompatiblen Kombinationen von Falschem Mehltau und Spinat (Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen).  
*Phytopathologische Zeitschrift*, **94**: 16-44
- Krug, H. (1991):** Gemüseproduktion: Ein Lehr-und Nachschlagewerk für Studium und Praxis  
2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- Lebeda, A., Schwinn, F. J. (1994):** The downy mildews-an overview of recent research progress.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **101**: 225-254
- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M., Jancova, D. (2001):** Review: The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **108**: 89-111
- Leskovar, D. I ., Black, M. C. (1994):** White rust infection and leaf chlorosis in relation to crop strategies in spinach.  
*Environmental and Experimental Botany*, **34**: 363-370
- Libbert, E. (1993):** Lehrbuch der Pflanzenphysiologie.  
5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena, 434 pp
- Lucas, J. A., Sherriff, C. (1988):** Pathogenesis and host specificity in downy mildew fungi  
In: Singh, R.S. et al. (Hrsg.), Recent Topics in Experimental and Conceptual Plant Pathology  
Oxford & IBH Publishing Co. Ltd, New Dehli, 321-349

- Lucas, J. A. (1998):** Disease Assessment and Forecasting.  
In: Plant Pathology and Plant Pathogens, 3. Auflage, Blackwell Science, Oxford, London, 54-71
- Lucas, J. A., Hayter, J. B. R., Crute, I. R. (1995):** The downy mildews: host specificity and pathogenesis.  
In: Kohmoto, K., Singh, U. S., Singh, R. P. (Hrsg.), Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Pergamon Press, Oxford, 217-238
- Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M., Ben-Yephet, Y. (1993):** Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation.  
*Phytopathology*, **84**: 98-101
- Mattusch, P., Meyer, E. (1997):** Falscher Mehltau bei Spinat.  
*Gemüse* **4**: 252-254
- Mauch-Mani, B. (2002):** Host resistance to downy mildew diseases  
In: Advances in Downy Mildew Research, Spencer-Phillips P. T. N., Gisi, U., Lebeda, A. (Hrsg.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, Niederlande, 59-84
- McCartney, H. A., Fitt, B. D. L. (1998):** Dispersal of foliar fungal plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns.  
In: Gareth Jones, D. (Hrsg.), The Epidemiology of Plant Diseases, Kluwer Publishers, Dordrecht, 138-160
- Mey, T. (1971):** Untersuchungen zur Umweltabhängigkeit des Falschen Mehltaus der Zuckerrübe (*Peronospora farinosa* (Fr.) Fr. f. sp. *betae* Byford).  
Univ. Bonn, Dissertation, 104 pp
- Michelmore, R. W., Iltott, T., Hulbert, S. H., Farrara, B. (1988):** The Downy Mildews.  
*Advances in Plant Pathology*, **6**: 53-79
- Miller, M. E., Amador, J. (1981):** Leafwetness hours over onion fields in the Lower Rio Grande Valley of Texas.  
Hrsg.: The Texas Agricultural Experiment Station, 12 pp
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction.  
*Methods of Enzymology*, **155**: 335-351
- Nali, C. (1993):** Il Miglioramento Genetico per la Resistenza alle malattie: Un lavoro senza fine. Il caso della peronospora dello spinacio.  
*Uniformatore Agrario*, **43**: 57-58
- Nali, C. (1998):** A novel threat for spinach in Italy: a new race of downy mildew.  
*Advances in Horticultural Science*, **12**: 179-182
- Nicholson, P., Rezanoor, H. N. (1994):** The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*.  
*Mycological Research*, **98**: 13-21

- Odenbach, W. (Hrsg.) (1997):** Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung.  
Parey Buchverlag, Berlin, 381 pp
- O'Brien, M. J., Webb, R. E. (1958):** Preservation of conidia of *Albugo occidentalis* and *Peronospora effusa*, obligate parasites of spinach.  
*Plant Disease Reporter*, **42**: 1312-1315
- Orlandini S.; Giuntoli A. (1998):** Photosynthesis of grapevine leaves infected by downy mildew.  
*Vigne et Vin Publications Internationales*, **32**: 121-127
- Palti, J. (1989):** Epidemiology, prediction and control of onion downy mildew caused by *Peronospora destructor*.  
*Phytoparasitica* **17**: 31-48
- Paran, I., Kesseli, R., Michelmore, R. (1991):** Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines.  
*Genome*, **34**: 1021-1027
- Paran, I., Michelmore, R. W. (1993):** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce.  
*Theoretical and Applied Genetics*, **85**: 985-993
- Parlevliet, J. E. (1967):** The influence of external factors on the growth and development of spinach cultivars (*Spinacia oleracea* L.).  
*Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen Nederland* **67-2**: 1-75
- Pegg, G. F., Mence, M. J. (1970):** The biology of *Peronospora viciae* on pea: laboratory experiments on the effects of temperature, relative humidity and light on the production, germination and infectivity of sporangia.  
*Annals of Applied Biology*, **66**: 417-428
- Peirce, L. C. (1987):** Vegetables: Characteristics, Production, and Marketing,  
John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 433 pp
- Pielat, A., van den Bosch, F. (1998):** A model for dispersal of plant pathogens by rainsplash.  
*IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology*, **15**: 117-134
- Pietrek G., Zinkernagel V. (2002):** Differentiation of the physiological races of *Peronospora valerianellae* with a differential set of cultivars and RAPD-PCR.  
*Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **109**: 329-337
- Pietrek, G. (2000):** Die Wirt-Pathogen-Beziehung von *Valerianella locusta* (L.) Laterr. und *Peronospora valerianellae* Fuckel als Grundlage der Resistenzzüchtung.  
TU München, Dissertation, 122 pp

- Populer, C. (1981):** Epidemiology of downy mildews.  
In: Spencer, D.W. (Hrsg.), The downy mildews.  
Academic Press, London, New York, San Francisco, 56-101
- Rampold, C. (2000):** Die kleine Marktstudie: Spinat.  
*Gemüse*, **5/2000**: 54-55
- Rehmany, A., Lynn, J. R., Tör, M., Holub, E. B., Beynon, J. L. (2000):** A comparison of *Peronospora parasitica* (Downy mildew) isolates from *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* using amplified fragment length polymorphism and internal transcribed spacer 1 sequence analysis.  
*Fungal Genetics and Biology*, **30**: 95-103
- Reuveni, M., Tuzun, S., Cole, J. S., Siegel, M. R., Kuc, J. (1986):** The effects of plant age and leaf position on the susceptibility of tobacco.  
*Phytopathology*, **4**: 455-458
- Richards, M. C. (1939):** Downy mildew of spinach and its control.  
*Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin*, **718**: 1-29
- Roeckel-Drevet, P., Coelho, V., Tourvielle, J., Nicolas, P., Tourvielle de Labrouhe, D. (1997):** Lack of genetic variability in French identified races of *Plasmopara halstedii*, the cause of downy mildew in sunflower(*Helianthus annuus*).  
*Canadian Journal of Microbiology*, **43**: 260-263
- Rotem, J., Wooding, B., Aylor, D. E. (1985):** The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores.  
*Phytopathology*, **75**: 510-512
- Rotem, J., Aust, H. J. (1991):** The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules.  
*Journal of Phytopathology*, **133**: 76-84
- Rumbolz J., Wirtz, S., Kassemeyer, H. H., Guggenheim, R., Schafer, E., Buche, C. (2002):** Sporulation of *Plasmopara viticola* : differentiation and light regulation.  
*Plant Biology*, **4**: 413-422
- Sadravi, M., Etebarian, H. R., Torabi, M. (2000):**  
Downy mildew of spinach and possible mechanisms of resistance in some spinach cultivars  
*Seed and Plant*, **15**: Pe403-Pe412 en38
- Saharan, G. S., Verma, P., Nashaat, N. I. (1997):** Monograph on Downy Mildew of Crucifers  
Saskatoon Research Centre, Technical Bulletin 1997-01  
Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada
- Sargent, J. A. (1981):** The fine structure of downy mildews.  
In: Spencer, D.W. (Hrsg.), The downy mildews.  
Academic Press, London, New York, San Francisco, 183-236

- Satou, M., Horiuchi, S., Yamauchi, N. (1999):** Inoculum density and temperature condition required for favourable infection of downy mildew of spinach  
*Annals of Reporter Plant Protection North Japan*, **50**: 58-59
- Scharnhölz, A. (2000):** Spinat -Mehltau ist immer (noch) da  
*Monatsschrift, Magazin für den Gartenbau-Profi, Germany*, **8**: 569
- Scherm, H. (1994):** Biometeorology, Epidemiology, and Prediction of Downy Mildew of Lettuce (*Bremia lactucae*) in Coastal California.  
Ph. D. Thesis, University of California
- Scherm, H., van Bruggen, A. H. C. (1995):** Concurrent spore release and infection of lettuce by *Bremia lactucae* during morning with prolonged leaf wetness.  
*Phytopathology*, **85**: 552-555
- Schilling, A. G., Möller, E. M., Geiger, H. H. (1994):** RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*: Application for genotyping and species identification, pp 47-56  
In: Schots, A., Dewey, F. M., Oliver, R., Modern assays for plant pathogenics: identification, detection and quantification, CAB International, Oxford, 47-55
- Scholes J. D., Rolfe S. A. (1995):** How do biotrophic pathogens affect the photosynthetic metabolism of their hosts.  
*Aspects of Applied Biology*, **42**: 91-99
- Schum, A., Reimann-Philipp, R. (1982):** Competition phenomena between the three pathotypes of *Peronospora spinaciae* Laub. as a possible tool for the elimination of pathogenic races by controlled cultivation of host varieties.  
*Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, **88**: 13-24
- Sheen; T. (1974):** Studies in the storage of conidia of *Peronospora spinaciae* in spinach breeding.  
*Bulletin of Agricultural Research Taiwan*: 16-18
- Shtienberg, D. (1992):** Effects of foliar diseases on gas exchange processes: A comparative study.  
*Phytopathology*, **82**: 760-765
- Singh, U. P., Reddy, D. H. K. B., Gupta, S. (1988):** Production and dispersal of conidia of *Peronospora pisi* on pea leaves.  
*Journal of Phytopathology*, **123**: 97-104
- Singh, G., Kawatra, A., Sehgal, S. (2001):** Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots.  
*Plant Foods for Human Nutrition*, **56**: 359-364
- Shepherd, C. J.; Mandryk, M. (1962):** Auto-inhibitors of germination and sporulation in *Peronospora tabacina* Adam.  
*Transcripta of the British Mycological Society*, **45**: 233-244
- Smith, P.G. (1950):** Downy mildew immunity in spinach.  
*Phytopathology*, **40**:65-68



- Smith, P. G., Webb, R. E., Millett, A. M., Luhn, C. H. (1961):** Downy mildew on spinach.  
*California Agriculture*, 5
- Sussmann, A. S., Halvorsen, H. O. (1966):** Spores; Their dormancy and germination.  
Harper and Row, New York London, 269 pp
- Sutton, J. C., Hildebrand, P. D.(1985):** Environmental water in relation to *Peronospora destructor* and related pathogens.  
*Canadian Journal of Plant Pathology*, 7: 323-330
- Tham, F. Y., Lucas, J. A., Wilson, Z. A. (1994):** DNA fingerprinting of *Peronospora parasitica*, a biotrophic fungal pathogen of crucifers.  
*Theoretical and Applied Genetics*, 88: 490-496
- Uozumi, T., Kröber, H. (1967):** Der Einfluß des Lichtes auf die Konidienbildung von *Peronospora tabacina* Adam an Tabakblättern.  
*Phytopathologische Zeitschrift*, 59: 372-384
- van Asch, M. A. J., Frinking, H. D. (1988):** Heterothallism in *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*.  
*Transcripts of the British Mycological Society*, 91: 692-693
- van der Plank, J. E. (1963):** Plant Diseases: Epidemics and Control.  
Academic Press, New York, London, 349 pp
- van der Plank, J. E. (1982):** Host-Pathogen Interactions in Plant Disease.  
Academic Press, New York, London, 207 pp
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995):** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.  
*Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414
- Wang, R., Furumoto, T., Motoyama, K., Okazaki, K., Kondo, A., Fukui, H. (2002):** Possible antitumor promoters in *Spinacia oleracea* (spinach) and comparison of their contents among cultivars  
*Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 66, 248-254
- Weber, E. (1980):** Grundriß der biologischen Statistik.  
Gustav Fischer Verlag, Jena, 652 pp
- Wiglesworth, M. D., Nesmith, W. C., Schardl, C. L., Li, D., Siegel, M. R. (1994):** Use of specific repetitive sequences in *Peronospora tabacina* for the early detection of the tobacco blue mold.  
*Phytopathology*, 84: 425-430
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., Tingey, S. T. (1993):** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers.  
*Methods in Enzymology*, 218: 704-740

- Wilocquet, L., Colombet, D., Roogier, M., Fargues, J., Clerjeau, M. (1996):** Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew.  
*European Journal of Plant Pathology*, **102**: 441-449
- Wu, B. M.; Subbarao, K. V., Bruggen, A. H. C. (2000):** Factors affecting the survival of *Bremia lactucae* sporangia deposited on lettuce leaves.  
*Phytopathology*, **90**: 827-833
- Wyllie, T. D., Williams, L. F. (1965):** The effects of temperature and leaf age on the development of lesions caused by *Peronospora manshurica* on soybeans.  
*Phytopathology*, **55**: 166-170
- Yarwood, C. E. (1937):** The relation of light to the diurnal cycle of sporulation of certain downy mildews.  
*Journal of Agricultural Research*, **54**: 365-373
- Yarwood, C. E. (1939):** Relation of moisture to infection with some downy mildews and rusts.  
*Phytopathology*, **29**: 933-945
- Yarwood, C. E. (1967):** Responses to parasites.  
*Annual Review of Plant Physiology*, **18**: 419-438
- Yerkes, W. D., Shaw, C. G. (1959):** Taxonomy of the *Peronospora* species on Cruciferae and Chenopodiaceae.  
*Phytopathology*, **49**: 499-507
- Zander (2000):** Handwörterbuch der Pflanzennamen.  
Erhardt, W., Götz, E., Bödeker, N., Seybold, S. G. (Hrsg.), 16. Auflage, Ulmer Verlag Stuttgart, 990 pp
- Zink, F. W., Smith, P. G. (1958):** A second physiologic race of spinach downy mildew.  
*Plant Disease Reporter*, **42**: 818
- Zinkernagel, V. (1985):** Untersuchungen zur Anfälligkeit und Resistenz von *Lactuca sativa* var. *capitata* gegen Falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). II: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie des Wirt-Parasit-Verhältnisses.  
*Phytopathologische Zeitschrift*, **112**: 238-258

## Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Dr. A. Kofoet und Herrn Prof. Dr. V. Zinkernagel für die Ermöglichung der Bearbeitung dieses Projektes, für die geduldige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten und der Erstellung meiner Doktorarbeit. Die Arbeit hat mir dadurch viel Freude bereitet.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Hock bedanke ich mich für den Prüfungsvorsitz und bei Herrn Prof. Dr. W. Schnitzler für seinen Beitrag als Zweitgutachter.

Herzlich danken möchte ich allen Kollegen und Mitarbeitern am Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau in Großbeeren, besonders der Abteilung Pflanzengesundheit, die an diesem Projekt beteiligt waren und mir jeder Zeit große Hilfsbereitschaft entgegengebracht haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. C. Feller für die bereitwillige Beantwortung vieler Fragen zur Statistik, Herrn Dr. A. Heißner für Unterstützung und Diskussion bei den Versuchen in der Gaswechselkammer und Frau Dr. D. Grote und Frau Dr. R. Grosch für Erklärungen und Anregungen bei den RAPD-Untersuchungen. Sehr wichtig waren auch die stets aufmunternden Worte und der jederzeitige Rat zu meiner Arbeit, die mir Frau Dr. W. Xu entgegengebracht hat.

Herrn B. Schröder (IGLO, Unilever) möchte ich danken für stete Auskunftsbereitschaft und Unterstützung des Projektes aus Sicht der Praxis. Auch allen, die durch Einsenden von Falschen Mehltau -Proben einen wertvollen Beitrag zur Arbeit geleistet haben, sei hiermit gedankt.

Letztlich gilt mein Dank meiner Familie, die mir sehr viel Geduld, Verständnis und wenn nötig auch Aufmunterung während der Projektphase entgegengebracht hat.

## Lebenslauf

### **Persönliche Angaben:**

Name: Birte Deil (geb. Kammann)  
Geburtsdatum / -ort: 27. Oktober 1972 in Stade  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

### **Schulische Ausbildung:**

1977 – 1981 Glaisdale Primary School, Cheam, England  
1981 – 1984 Pestalozzi Grundschule, Stade  
1984 – 1985 Orientierungsstufe Camperhöhe, Stade  
1985 – 1987 Deutsche Schule, Oslo, Norwegen  
1987 – 1988 Gymnasium Atheneum, Stade  
1988 – 1993 Deutsche Schule London, England (Abitur)

### **Akademische Laufbahn:**

1993 – 1999 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München, Freising- Weihenstephan; Studienabschluss als Diplom-Agraringenieurin Univ.  
1999 – 2003 Tätigkeit als Doktorandin am Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München, Arbeitsort: Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren / Erfurt e.V. in Großbeeren

### **Weitere praktische Erfahrung:**

1993 Royal Horticultural Society Garden, Wisley, England  
1996 Landwirtschaftskammer Hannover, Obstbauversuchsanstalt Jork, Betrieb Esteburg  
1996 / 97 Verwaltung der Staatlichen Schlösser und Gärten Hessen, Außenstelle Seligenstadt, Ehem. Benediktiner Abtei  
1997 Hillier Nurseries Ltd, Romsey, England