

## Schlussbericht des Forschungsprojektes

# **Entwicklung von Zuchtmaterial von Basilikum (*Ocimum basilicum* L.) mit Resistenz gegen Falschen Mehltau (*Peronospora* sp.) und erhöhter Kältetoleranz**

### **Zuwendungsempfänger:**

Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.

**Aktenzeichen:** 28-1-41.012-06

**Projektdauer:** 01.04.2007 – 31.09.2010

**Bearbeiter:** Dr. Rita Grosch

### **Projektpartner:**

Dr. Peter Römer, GHG Saaten GmbH, Albert-Drosihn-Str. 9, 06449 Aschersleben

## **I. Kurzdarstellungen**

### **1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes**

Ziel des Forschungsvorhabens war es, resistente Genotypen aufzufinden, die als Kreuzungspartner im Zuchtprogramm der GHG Saaten Eingang finden sollten, um die Resistenz in eine Sorte einzulagern. Hierbei ist umfangreiches genetisches Material sowohl hinsichtlich des Verhaltens gegen den Schaderreger des Falschen Mehltaus als auch auf Kältetoleranz zu untersuchen. Neben bereits bestehenden Sorten sind auch neueres Zuchtmaterial der GHG Saaten und möglichst viele Genbank-Herkünfte in die Untersuchungen einzubeziehen. Da Resistenzen mit großer Wahrscheinlichkeit in genetischem Material vorkommen, welches von seinem optischen und geschmacklichen Eigenschaften relativ weit von den Wünschen der Endverbraucher abweicht, ist ein langwieriges Rückkreuzungsprogramm erforderlich, um die gewünschten Sorteneigenschaften einschließlich der Resistenz gegen den Falschen Mehltau in einer neu zu züchtenden Sorte zu erhalten.

Um die genannten Ziele des Vorhabens zu erreichen, wurden:

- die Biologie und Epidemiologie des Schaderregers untersucht,
- eine Methode zum Resistenzscreening an Basilikum-Pflanzen entwickelt,
- die Resistenz gegen den Falschen Mehltau an Basilikum-Herkünften geprüft,
- das Saatgut als Inokulumquelle bewertet,
- die Kältetoleranz von Genotypen geprüft und
- an der Entwicklung einer marktfähigen Basilikum-Sorte mit Kältetoleranz und Resistenz gegen Falschen Mehltau gearbeitet.

Der vorliegende Schlussbericht geht ausschließlich auf die Ziele ein, die sich mit dem Erreger des Falschen Mehltaus an Basilikum, der seit 2009 als *Peronospora belbahrii* benannt wird (Thines et al., 2009), befassen. Die Ergebnisse zur Kältetoleranz wurden vom Projektpartner GHG Saaten dargestellt.

### **2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Seit dem Jahr 2002 hat sich der Falsche Mehltau (*P. belbahrii*) an Basilikum (*Ocimum basilicum*) flächendeckend in Deutschland, vor allem im Raum Papenburg, dem größten deutschen Anbaugbiet von Küchenkräutern mit einer Anbaufläche von rund 25 ha und einer Jahresproduktion von ca. 50 Millionen Töpfen, verbreitet. Nach Aussagen von Beratern und Produzenten war das Auftreten des Erregers besonders in den Monaten mit zunehmender Temperatur zu verzeichnen. Dieses hohe Temperaturoptimum ist untypisch für viele Peronosporaceae. Basilikum wird im Gewächshaus produziert und damit unter idealen Bedingungen für einen Befall und die Ausbreitung des Erregers. Der Falsche Mehltau tritt zunächst nesterweise auf und die Sporen werden windbürtig im Bestand und letztlich im gesamten Anbaugbiet verbreitet. Töpfe mit befallenen Pflanzen lassen sich nicht mehr verkaufen und stellen

einen großen wirtschaftlichen Schaden für den Basilikumproduzenten dar. Die Bekämpfung des Falschen Mehltaus erfolgt im konventionellen Anbau mit den Wirkstoffen Propamocarb, Mancozeb und Metalaxyl in Form von Saatgutbeizung bzw. im Jungpflanzenstadium - unter Einhaltung einer Wartezeit von vier Wochen. Das Auftreten des Falschen Mehltaus im Basilikumanbau wird dadurch jedoch nicht verhindert und der Einsatz von Fungiziden in einem späten Entwicklungsstadium der Pflanze ist nicht zugelassen. Die derzeit überwiegend angebauten Sorten weisen keine Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber dem Falschen Mehltau auf.

Aufgrund der Anforderungen von Basilikum an höhere Temperaturbedingungen erfolgt die Saatgutproduktion in Ländern wie Indien und Italien. Mit dem Erreger kontaminiertes Saatgut wird als Ursache für die schnelle Verbreitung des Falschen Mehltaus in verschiedenen Anbaugebieten der Welt angesehen. Die Bedeutung der Saatgutübertragbarkeit des Falschen Mehltaus war jedoch zu Beginn des Vorhabens nicht ausreichend geklärt. Die Ermittlung des Saatgutbefalls erfolgte bisher unspezifisch durch Auszählen anhaftender Oosporen, die jedoch nicht zweifelsfrei als Dauersporen des Falschen Mehltaus identifiziert werden können. Entsprechend gab es keinen zwingenden Zusammenhang von Saatgutbefall und Krankheitsauftreten. Zum Zeitpunkt der Antragstellung gab es keine Untersuchungen zur Biologie des Erregers in Basilikum.

Der Falsche Mehltau an Basilikum ist ein neuer und wirtschaftlich bedeutender Schaderreger, der die Wirtschaftlichkeit der Gartenbaubetriebe und auch der Züchtung signifikant beeinträchtigen kann. Da es bisher an Kenntnissen zur Epidemiologie des Pilzes fehlt, konnten noch keine wirksamen Bekämpfungsstrategien entwickelt werden. Der Anbau resistenter Sorten stellt dabei die sicherste Bekämpfungsmaßnahme dar. Mehltau-tolerante Sorten würden aus der Sicht der Gartenbaubetriebe die Produktion von Topfbasilikum sicherer und durch die Einsparung von Pflanzenschutzmitteln kostengünstiger gestalten.

### **3 Planung und Ablauf des Vorhabens**

Innerhalb des Forschungsvorhabens wurden zunächst unter kontrollierten Bedingungen Untersuchungen zur Biologie von *P. belbahrii* an Basilikum durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen zur Biologie des Erregers wurde eine Resistenzprüfmethode unter kontrollierten Bedingungen etabliert. Ein umfangreiches Sortiment von Herkünften, bereit gestellt vom Kooperationspartner und der Genbank, wurde auf Anfälligkeit gegenüber *P. belbahrii* geprüft. Die Resistenz wurde anhand der Symptomausprägung an der Pflanze qualitativ ermittelt. Genotypen, die nach künstlicher Inokulation mit dem Erreger keine Symptome des Falschen Mehltaus aufwiesen, wurden - nach wiederholter Prüfung - vom Kooperationspartner GHG Saaten zur Züchtung genutzt.

Im Rahmen des Projektes wurde auch eine Methode zum Nachweis des Erregers am Saatgut mittels spezifischer PCR etabliert. Die Bewertung der Samenkontamination erfolgte parallel zum PCR-gestützten Nachweis mittels des grow-out Tests.

Zur Erfassung der genetischen Variabilität des Pathogens wurde 2008 und 2009 eine Stammsammlung mit Isolaten von *P. belbahrii* aufgebaut. Die Virulenz der Isolate wurde *in vivo* geprüft.

#### **4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

*O. basilicum* L. (Lamaiceae) wird weltweit in unterschiedlichen Klimazonen kultiviert, von den gemäßigten Zonen über die Subtropen bis in die Tropen. Die Art wird in zwei Subspecies unterteilt, *ssp. minimum* L., die in Griechenland und Indien auch als Zierpflanze angebaut wird und *ssp. basilicum* (syn. *O. thrysiflorum* L., *O. medium* Mill., *O. bullatum* Lam., *O. integerrimum* Willd.) (Maass, 1986). Von *O. basilicum* existieren unterschiedliche Selektionen (Genoveser, Neapolitanisches, Griechisches, Türkisches, Grünes Krauses, Rotes Krauses, Feines Grünes, Ararat, Osmin, Dark Opal, Zitronenbasilikum, Thaibasilikum, Anisbasilikum, etc.), die sich in Habitus und Inhaltsstoffen unterscheiden. Neben *O. basilicum* werden weitere Arten (*O. americanum*, *O. canum*, *O. gratissimum*, *O. kilimanscharicum*, *O. micranthemum*, *O. sanctum*, *O. selloi*) und Arthybriden (*O. canum x basilicum*, *O. kilimandscharicum x basilicum*) als Gewürz- und Heilpflanzen kultiviert.

Das Auftreten von Falschem Mehltau an Basilikum wurde erstmals 1932 in Uganda von Hansford (1932) beobachtet. 2001 wurde der Erreger in der Schweiz beschrieben (Heller und Baroffio et al., 2005) gefolgt vom weiteren Auftreten in anderen europäischen Ländern: 2002 in Deutschland, 2003 in Italien (Garibaldi et al., 2004) und 2004 in Frankreich (Garibaldi et al., 2005). Der Falsche Mehltau an Basilikum ist verantwortlich für massive Verluste bis hin zum Totalausfall im Basilikumanbau unter Gewächshausbedingungen. In den letzten Jahren nahm aufgrund der eingeschränkten Anwendung von Fungiziden im Kräuteraanbau das wirtschaftliche Schadensausmaß im deutschen Anbau stetig zu (mdl. Aussage Berater-ring Papenburg). Der Einsatz von Metalaxyl wurde zum Zeitpunkt der Antragstellung nach §18 b Pflanzenschutzgesetz begrenzt genehmigt. Der Falsche Mehltau an Basilikum wurde ursprünglich als *Peronospora lamii*, der an Salbei vorkommt, beschrieben (Gumedzoe et al. 1998, Heller und Baroffio, 2003). Neue Ergebnisse wiesen jedoch auf eine eigene, neue *Peronospora*-Species hin (Garibaldi et al. 2003, Belbahri et al. 2005), die auch am Saatgut nachgewiesen wurde. Für den artspezifischen DNA-Nachweis entwickelten Belbahri et al. (2005) einen spezifischen Primer.

## Referenzen

- Belbahri, L., Calmin, G., Pawlowski, J., Lefort, F. 2005. Phylogenetic analysis and Real Time PCR detection of a presumably undescribed *Peronospora* species on sweet basil and sage. *Mycological Research* 109: 1276-1287.
- Garibaldi, A., Minuto, A., Minuto, G., Gullino, M. L. 2004. First report of downy mildew on basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. *Plant Disease* 88: 312-312.
- Gumedzoe, M. Y. D., Hemou, P., Lepage, A., Lecat, N. 1998. Inventaire et identification de *Peronospora lamii* (Al.Br.) de By, agent causal du mildiou du basilic (*Ocimum basilicum*) dans les exploitations de Gyma Cultures. Les VIIIe Journées Scientifiques de l'Université du Bénin.
- Hansford, C.G. 1933. Annual report of the mycologist. *Review of Applied Mycology* 12: 421-422.
- Heller, W., Baroffio, C. 2003. Le mildiou (*Peronospora lamii*) du basilic progresse! *Der Gemüsebau/Le Maraîcher* 8: 12-13.
- Heller, W. and Zoller, C. 2010. Desinfektion von Basilikum-Saatgut ist eine Herausforderung. *Agrarforschung Schweiz* 1 (5): 190-193.
- Maass, H.J., Labiatae. In: Schultze-Motel, J. (Hrsg.): *Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher und gärtnerischer Kulturpflanzen*. Akademie-Verlag, Berlin, Bd. 3, 1127-1179, 1986.
- Schmidt, Ulrike: Falscher Mehltau an Basilikum; *Gemüse* 3, 2004. 30 – 31.
- Thines, M., Telle, S., Ploch, S., Runge, F. 2009. Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus and sage with implications for quarantine measures. *Mycological Research* 113: 532-540.

## II. Eingehende Darstellungen

### 1 Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

#### 1.1 Biologie von *Peronospora belbahrii*

Die Entwicklung einer Resistenzprüfmethode basiert auf den Erkenntnissen zur Biologie des Pathogens. Daher wurden unter kontrollierten Bedingungen zunächst die Parameter für die Keimung Sporulation, Latenz und Infektion von *P. belbahrii* an Basilikum untersucht. Die auf diesen Ergebnissen entwickelte Resistenzprüfmethode wurde für die Prüfung der Genotypen angewendet.

#### Herstellung des Inokulums von *P. belbahrii*

In allen Versuchen wurde das Isolat PA06 verwendet, welches 2006 von der Sorte ‚Bavires‘ in einem Praxisbetrieb isoliert wurde. Als obligater Parasit wurde das Inokulum von *P. belbahrii* regelmäßig auf Basilikumpflanzen der Sorte ‚Bavires‘ unter Gewächshausbedingungen angezogen. Die Sporen wurden von den Blättern abgepinselt, gezählt und bei -20 °C eingefroren.

#### Kultivierung von Basilikum

Basilikum wurde in ausreichender Menge (8-10 Körner) in Töpfen (Ø 9) ausgesät und letztlich auf vier Pflanzen vereinzelt. Die Kultivierung von Basilikum erfolgte in allen Versuchen

unter praxisnahen Anzuchtbedingungen (Tag-/Nachttemperatur von 23/18 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 60 und 70 %; von Oktober bis April: Zusatzbelichtung von insgesamt vier Stunden (Lampentyp: SON-T 400 W, Philips). Jede Variante umfasste fünf Wiederholungen, die randomisiert angeordnet wurden. Zur Begünstigung der Infektion und der Sporulation von *P. belbahrii* wurden die Pflanzen wöchentlich für 20 Stunden bei 20 °C, 95-100 % relativer Luftfeuchte und Dunkelheit inkubiert. Bonitiert wurden die Befallshäufigkeit und die Befallsstärke (BS). Die Ermittlung der BS erfolgte in Boniturstufen, die einer prozentual zum Blatt berechneten, befallenen Blattfläche (mit Sporangienrasen überzogene Fläche) entsprachen (Tab.1).

Tab.1: Boniturschema des Falschen Mehltaus an Basilikum

Boniturstufen	bef. Blattfläche [%]	Mittel [%]
1	0	0
2	< 0,1	0,05
3	< 5	2,45
4	< 10	7,5
5	< 30	20
6	< 60	45
7	< 90	75
8	> 90	95

#### Einfluss der Temperatur auf die Keimfähigkeit von *P. belbahrii* Sporen *in vitro*

Auf Wasseragar (1,5 %) wurde eine Sporenlösung von 10<sup>5</sup> Sporen/ml ausgebracht und bei 5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C im Dunkeln inkubiert. Nach 2, 4, 8, 12, 24 und 48 h wurde die Keimrate anhand von Keimschlauchbildung ermittelt.

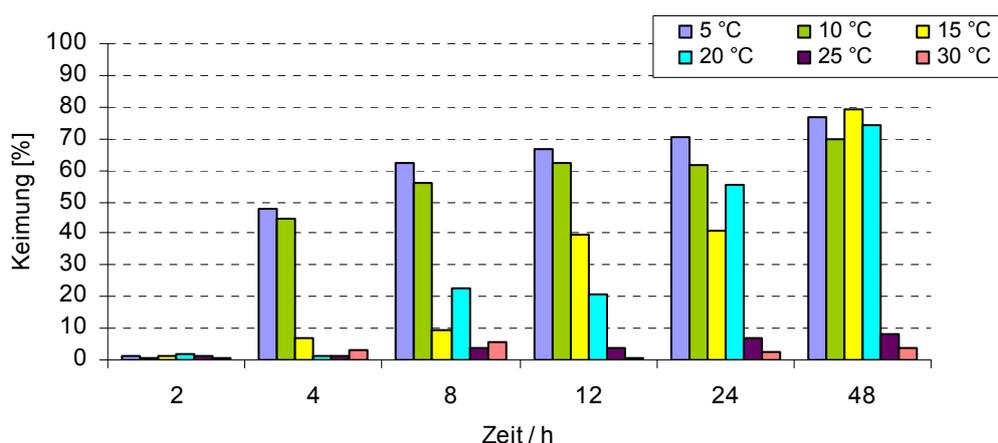


Abb. 1: Einfluss der Temperatur (5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C) auf die Sporenkeimung von *Peronospora belbahrii* nach 2, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden; Tukey-Test,  $\alpha = 0,05$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass die Keimung der Sporen signifikant von der Temperatur beeinflusst wird. Bei 5 und 10 °C keimten fast 50 % der Sporen nach 4 h, während bei 15 und 20 °C die Keimung der Sporen deutlich verzögert war. Nach 12 h war bei 5 und 10 °C eine

Keimrate von 60 bis 65 % zu verzeichnen und bei 15 und 20 °C von 20 bzw. 40 % (Abb. 1). Nach 48 h waren bei 5 bis 20 °C vergleichbare Keimraten zu beobachten. Bei Temperaturen über 25 °C wurde nur eine geringe Keimrate ermittelt.

#### Einfluss der Temperatur auf die Infektion von *Peronospora belbahrii* ( $T_{inf}$ )

Vier Pflanzen eines Topfes wurden im 4-Blattstadium mit 5 ml Sporenlösung von  $1-2 \times 10^5$  Sporen/ml besprüht. Zur Ermittlung der für *P. belbahrii* optimalen Infektionstemperatur wurden die Pflanzen nach der Inokulation für 24 h bei Temperaturen von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 100 % bei Dunkelheit inkubiert. Nach fünf, sieben, neun und zwölf Tagen wurde die BS bonitiert.

Die Infektionstemperatur beeinflusste signifikant die BS von *P. belbahrii* an Basilikum (Abb. 2). Fünf Tage nach der Inokulation des Erregers waren noch keine Symptome zu beobachten. Ein signifikanter Anstieg der BS war nach sieben Tagen festzustellen. Bei Infektionstemperaturen von 10, 15 und 20 °C waren neun Tage nach der Inokulation bereits etwa 90 % der Blattfläche mit *P. belbahrii* befallen. Infektionstemperaturen von 5 und 25 °C führten zu reduzierten, jedoch vergleichbaren Befallsverläufen des Falschen Mehltaus an Basilikum. Bei Temperaturen von 30 °C erfolgte keine haftende Infektion von *P. belbahrii*.

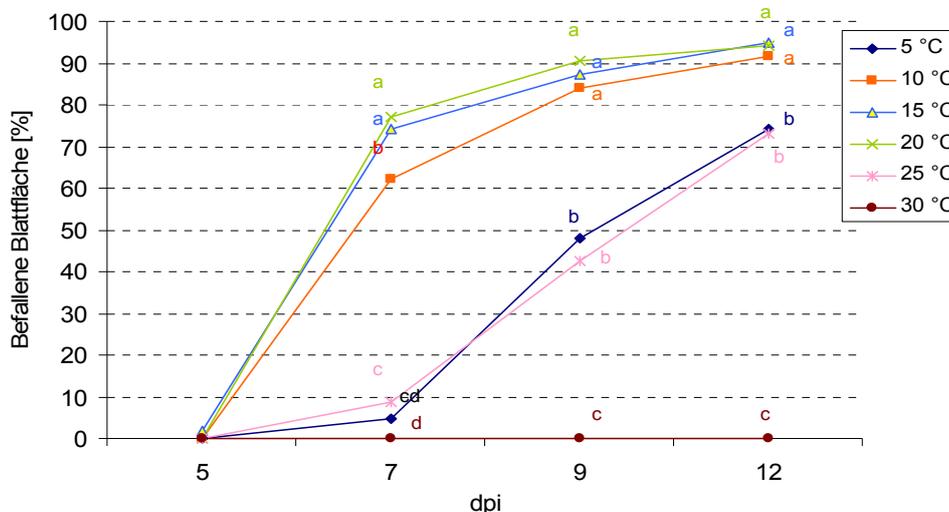


Abb. 2: Einfluss der Temperatur (5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C) auf die Infektion von *Peronospora belbahrii* 5, 7, 9 und 12 Tage nach Inokulation (dpi); Tukey-Test,  $\alpha = 0,05$ .

#### Einfluss der Temperatur nach der Infektion auf die BS von *Peronospora belbahrii* ( $T_{spor}$ )

Der Einfluss der Inkubationstemperatur nach der Infektion auf die BS wurde bei 5, 10, 15, 20, 25 und 30 °C geprüft. Die BS wurde 5, 7, 9 und 12 Tage nach der Infektion bonitiert.

Inkubationstemperaturen von 15 bis 25 °C führen zu vergleichbaren Befallsverläufen von *P. belbahrii* an Basilikum (Abb. 3). Bei einer Inkubationstemperatur von 10 °C war ein deutlich

verzögerter Krankheitsverlauf zu beobachten. Bei Inkubationstemperaturen von 5 und 10 °C war keine Krankheitsentwicklung von *P. belbahrii* an Basilikum gegeben.

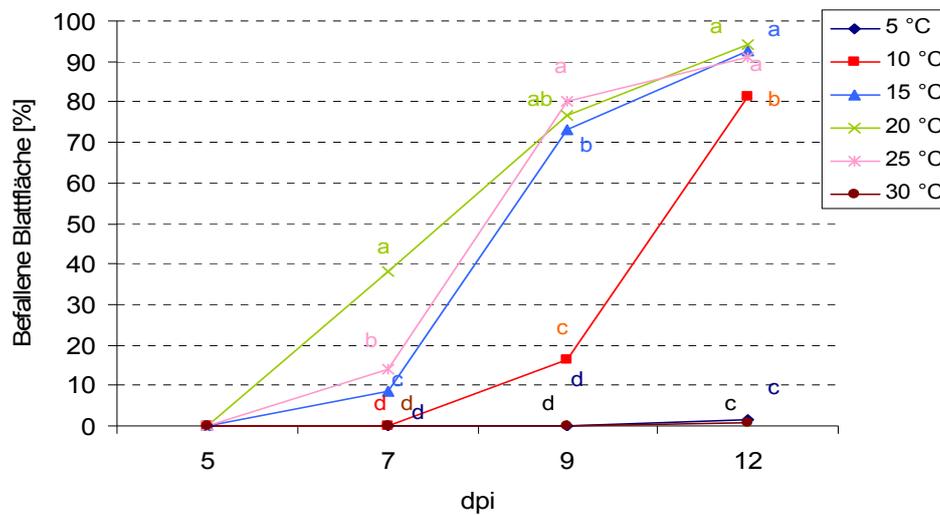


Abb. 3: Einfluss der Temperatur (5, 10, 15, 20, 25, 30°C) auf die Krankheitsentwicklung von *Peronospora belbahrii* 5, 7, 9 und 12 Tage nach der Inokulation (dpi); Tukey-Test,  $\alpha = 0,05$ .

#### Einfluss des Inokulums auf die Befallsstärke

Zur Ermittlung des Einflusses von frischem und gefrorenem Inokulummaterial sowie die Sporenzahl auf den Befall, wurden Basilikumpflanzen im 4-Blattstadium inokuliert. Inokuliert wurden Sporenzahlen von  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Sporen/ml mit jeweils frischen und gefrorenen Sporen. Nach 7, 9 und 14 Tagen wurden die Befallshäufigkeit und die BS erfasst.

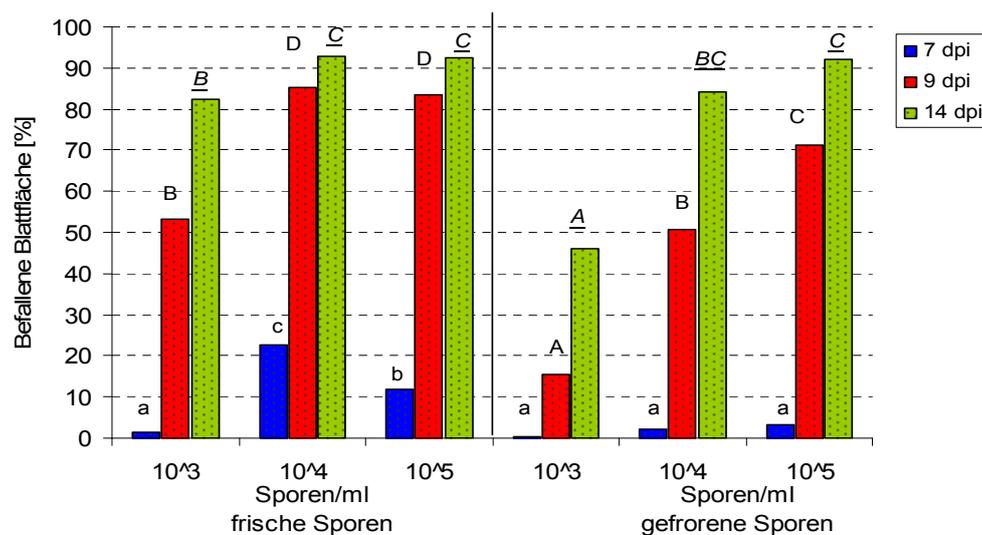


Abb.4: Einfluss des Inokulums und der Sporenzahl von *Peronospora belbahrii* auf die Befallsstärke 7, 9 und 14 Tage nach Inokulation (dpi); Tukey-Test,  $\alpha = 0,05$ .

Die Inokulation von zuvor gefrorenem Sporenmateriale führt im Vergleich zur Inokulation von frischer Sporensuspension zu einer geringeren BS. Zwei Wochen nach der Inokulation wa-

ren bei Inokulation von  $10^5$  Sporen/ml keine signifikanten Unterschiede nach Inokulation von frischem und gefrorenem Sporenmateriale zu verzeichnen (Abb. 4).

#### Etablierung einer Resistenzprüfmethode

Basierend auf den Ergebnissen zur Pathogenese von *P. belbahrii* wurden für die Resistenzprüfung unter kontrollierten Bedingungen folgende Bedingungen gewählt: Inokulation von vier Basilikumpflanzen im 4-Blattstadium mit 5 ml zuvor gefrorener Sporensuspension ( $10^5$  Sporen/ml) von *P. belbahrii*, 24-stündige Inkubation der inokulierten Pflanzen bei 20 °C Infektionstemperatur ( $T_{inf}$ ) und 100 % Luftfeuchtigkeit in Dunkelheit, Kultivierung bei 23/18 °C, 60-70 % relativer Luftfeuchtigkeit und 12 h Tag- und Nachtwechsel in Klimakammern. Nach 6, 8 und 11 Tagen erfolgte eine erneute Inkubation der Pflanzen bei 20 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln.

Die Bonitur der BS der inokulierten ersten vier Laubblätter erfolgte sieben, neun und 14 Tage nach Inokulation. Ziel der Bonitur war die Erfassung einer qualitativen Resistenz (Ja / Nein).

### **1.2 Resistenzprüfung von Basilikum-Sorten und -Genotypen**

Insgesamt wurden 249 von GHG Saaten zur Verfügung gestellte Genotypen auf Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau unter den oben angegebenen Bedingungen getestet. Die Prüfungen der Genotypen erfolgten in Klimakammern (York, Mannheim, Germany). In allen Untersuchungen wurden die Pflanzen mit Sporenlösungen des Isolates PA06 inokuliert und als Referenz die Sorte ‚Bavires‘ mitgeprüft. Jede Variante umfasste 5 Wiederholungen mit je vier Pflanzen, die randomisiert angeordnet wurden.

Von den insgesamt 249 geprüften Genotypen zeigten lediglich fünf Herkünfte (Genotypen 61, 69, 72, 83 und 84) wiederholt eine Resistenz gegen *Peronospora* sp., die für Züchtung einer Basilikumsorte mit dem Merkmal Resistenz gegen *P. belbahrii* von Interesse waren.

### **1.3 Resistenzprüfung von Arten**

Zur Bestimmung des Wirtspflanzenkreises wurden einige im Handel erhältliche Vertreter der Gattung *Ocimum*, und anderer Gattungen der Familie der Lamiaceae entsprechend der oben beschriebenen Resistenzprüfmethode auf Anfälligkeit gegenüber dem Erreger des Falschen Mehltaus geprüft.

Einige Arten waren gegenüber *Peronospora belbahrii* resistent.

### **1.5 Einfluss von Kulturbedingungen auf die Krankheitsentwicklung**

Sowohl die Krankheitsentwicklung als auch die Ausbreitung des Erregers des Falschen Mehltaus an Basilikum werden durch die gegebenen Umweltbedingungen stark beeinflusst. Die optimalen Temperaturen für die Kultivierung von Basilikum liegen bei 23 °C am Tag und 18 °C in der Nacht. Eine hohe natürliche Lichtintensität in lichtreichen Monaten sowie Zu-

satzbelichtung in lichtarmen Jahreszeiten ist für das Wachstum der Pflanzen von Vorteil. Da *Peronospora* sp. sehr an die hohen Temperatur- und Lichtansprüchen seiner Wirtspflanze angepasst ist, stellt sich die Frage, ob Veränderungen der Kulturbedingungen wie Temperatur und Lichtintensität die Krankheitsentwicklung und allgemein den Befall negativ beeinflussen, so dass die Klimasteuerung als eine mögliche Bekämpfungsstrategie betrachtet werden könnte.

Der Einfluss von *Peronospora* sp. auf die Krankheitsentwicklung wurde an der Sorte ‚Bavires‘ und den Genotypen ‚KST1‘ und ‚KST2‘ (GHG Saaten) durchgeführt. Letztere sind Genotypen, die speziell auf Kältetoleranz gezüchtet wurden. Die mit dem Erreger inokulierten Pflanzen wurden in der Klimakammer unter folgenden Temperatur- und Lichtbedingungen kultiviert: a) 23/18 °C und 440  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$ ; b) 18/18 °C und 440  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$ ; c) 23/18 °C und 200  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$  und d) 18/18 °C und 200  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$ . Jede Variante umfasste 8 Wiederholungen mit je vier Pflanzen. Je vier Pflanzen wurden im 4-Blattstadium mit 5 ml einer Sporenlösung von  $10^3$  Sporen/ml inokuliert und nach der Inkubation in der Klimakammer weiter kultiviert. Die Kontrollen wurden mit Wasser inokuliert. Der Befallsverlauf wurde bei der Sorte ‚Bavires‘ zusätzlich auch unter Berücksichtigung der praxisüblichen Pflanzendichte von 40 Pflanzen je Topf untersucht, wobei die BS, anders als die restlichen Varianten, mit nur einer Boniturnote über die gesamten Pflanzen pro Topf geschätzt wurde. Die Befallserhebung erfolgte 7 und 22 Tage nach der Erregerinokulation. Die Temperatur ( $T_{\text{spor}}$ ) zur Förderung der Sporulation entsprach der Bestandestemperatur der jeweiligen Varianten (a, b, c und d).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die BS des Falschen Mehltaus von der Temperatur beeinflusst wird (Abb. 5). Kulturbedingungen von 18 °C verzögern zunächst die Befallsentwicklung, doch 22 Tage nach der Erregerinokulation waren bei allen drei Sorten keine Unterschiede in der BS zu beobachten. Kein Einfluss auf die BS von *P. belbahrii* an Basilikum war durch die gegebenen Lichtbedingungen von 440 und 200  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$  zu verzeichnen. Bei 440  $\mu\text{Mol}/\text{m}^2\text{sec}$  zeigten sich die Genotypen KST1 und KST2 sieben Tage nach der Erregerinokulation als weniger empfindlich im Vergleich zur Sorte ‚Bavires‘ (Abb. 5A). Diese Unterschiede waren jedoch 22 Tage nach der Inokulation nicht mehr gegeben. Eine höhere Aussaatdichte resultierte 22 Tage nach der Inokulation in einer geringeren BS (Abb. 5B). Eine Unterdrückung des Falschen Mehltaus an Basilikum war durch Veränderung der Kulturbedingungen (Temperatur, Licht) somit nicht möglich. Kühlere Temperaturen und eine geringere Lichtintensität führten außerdem zu physiologischen Schäden an den Blättern (Chlorosen).

Die nichtinokulierten Kontrollen wiesen 22 Tage nach der Inokulation der „Pathogenvarianten“ ebenfalls Symptome des Falschen Mehltaus auf, was die Übertragung des Erregers durch die Luft bestätigt.

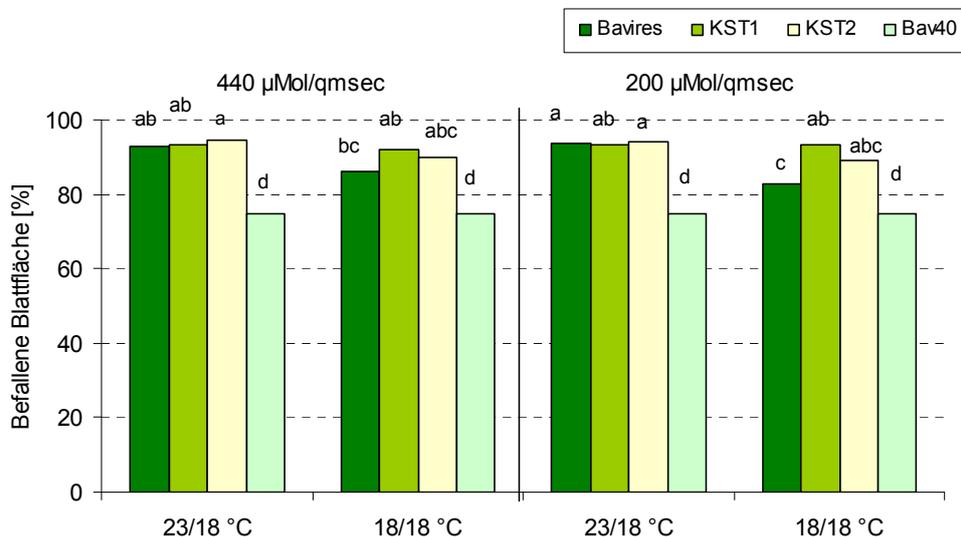
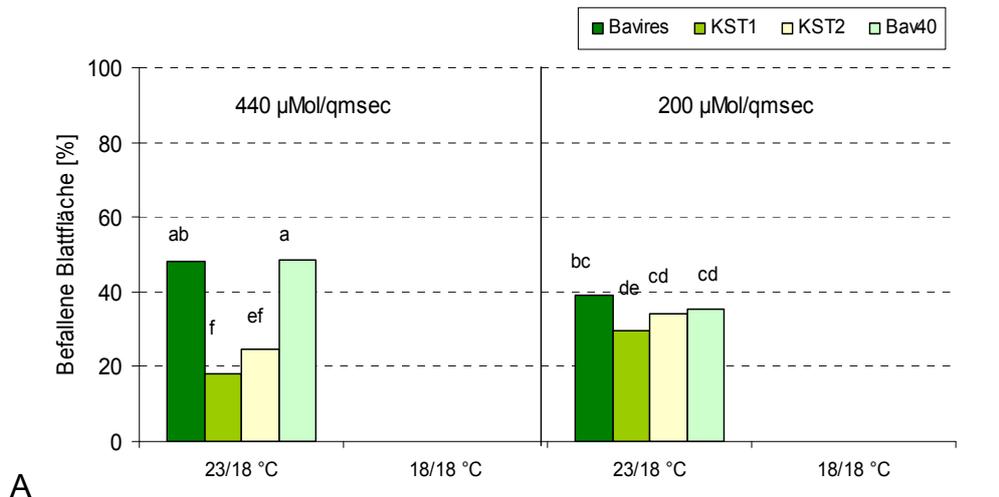


Abb. 5: Einfluss von Temperatur- und Lichtbedingungen auf die befallene Blattfläche von Basilikum ‚Bavires‘, ‚KST1‘, ‚KST2‘ und ‚Bavires‘ mit 40 Korn, 7 (A) und 22 Tage (B) nach der Inokulation mit *Peronospora belbahrii*; Tukey-Test,  $\alpha = 0,05$ .

### 1.6 Nachweis von *Peronospora belbahrii* am Saatgut

Eine schnelle und verlässliche Methode zum Nachweis des saatgutübertragbaren Erregers *P. belbahrii* ist sowohl für den Züchter als auch Anbauer von großer Bedeutung, da die Epidemie im Basilikumbestand meist von einzelnen kranken Pflanzen ausgeht. Mit *P. belbahrii* kontaminiertes Saatgut kann Ursache für den Befall einzelner Pflanzen und damit für das Auftreten von Epidemien sein.

#### Nachweisgrenze von *P. belbahrii* ausgehend von einer reinen Sporenkultur

Für den spezifischen Nachweis von *P. belbahrii* am Saatgut ist ein Primerpaar (Bas-Primer) für einen spezifischen PCR-gestützten Nachweis verfügbar. Zunächst wurde die Nachweis-

grenze für *P. belbahrii* ermittelt. Dazu wurde aus einer Sporenlösung von  $10^6$  Sporen/ml eine Verdünnungsreihe hergestellt und die DNA aus jeder Verdünnungsstufe extrahiert.

Der Erreger *P. belbahrii* konnte in einer einfachen PCR bis zu einer Sporenkonzentration von  $10^3$  Sporen/ml sicher nachgewiesen werden.

#### Nachweis von *P. belbahrii* am Saatgut

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Erregers am Saatgut wurde befallfreies Saatgut der Sorte ‚Basinova‘, bereitgestellt von der GHG Saaten, mit Sporenlösungen unterschiedlicher Dichte ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 Sporen/ml) inokuliert. Der PCR-gestützte Nachweis erfolgte zum einen nach Reisolierung der Sporen vom Saatgut entsprechend der Oosporen-Abwasch-Methode nach LUFA und zum anderen durch direkten Nachweis an inokuliertem Saatgut.

Die Rückisolierung der Sporen des Erregers von dem inokulierten Saatgut entsprechend der Methode nach LUFA erfolgte durch Zugabe von 0,4 ml Ethanol und zwei Tropfen Glycerin und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 18 h. Die Sporen wurden mechanisch mit Hilfe von Glasperlen reisoliert und bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Die DNA-Extraktion erfolgte aus der verdichteten Sporenlösung.

Vor dem direkten Nachweis von *P. belbahrii* an künstlich mit dem Erreger inokulierten Saatkörnern wurden diese vor der Zugabe von Ethanol und Glycerin bei 4 °C über Nacht aufbewahrt. Das inokulierte Saatgut wurde in einer Schwingmühle mit Hilfe von Stahlkugeln in CTAB aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNA-Extraktion aus der Lösung extrahiert.

Sowohl bei Nachweis von *P. belbahrii* aus der Lösung entsprechend der Methode nach LUFA als auch nach direkter DNA-Extraktion von kontaminiertem Saatgut konnten bis zu  $10^4$  Sporen/100 Korn sicher nachgewiesen werden (Abb. 6).

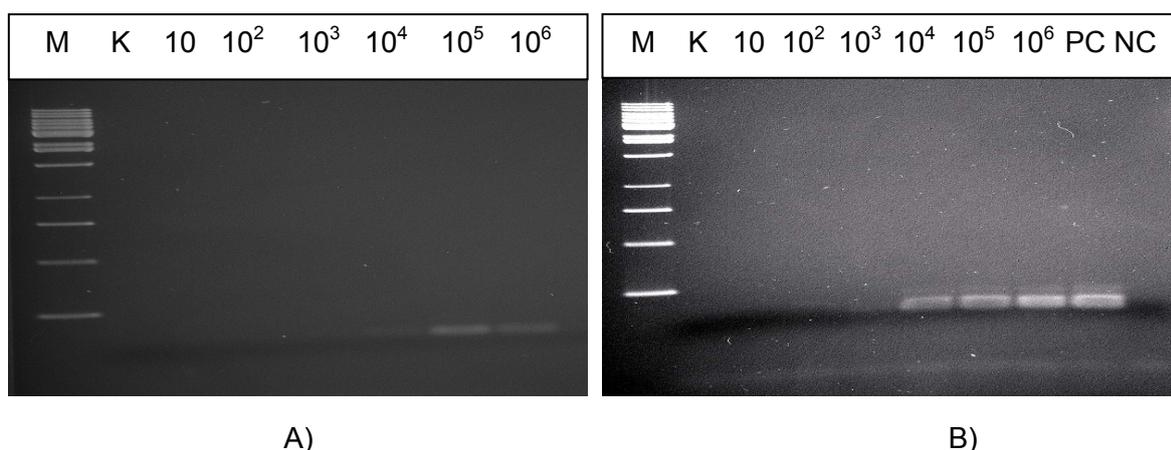


Abb. 6: PCR-gestützter Nachweis von *Peronospora* sp. an Basilikumsaatgut ‚Basinova‘ in Abhängigkeit von der applizierten Sporenzahl ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 Sporen/ml) nach direkter DNA-Extraktion von künstlich inokuliertem Saatgut (A) und Nachweis der Sporen in der Lösung nach mechanischer Reisolierung (LUFA) von inokuliertem Saatgut (B); PC: Positivkontrolle, NC: Negativkontrolle; M: Marker (100 bp).

Mit Hilfe der direkten PCR-gestützten Nachweismethode konnte der Erreger *P. belbahrii* an natürlich infizierten Saatgutpartien (MT1, MT2, MT3) nachgewiesen werden. Diese stammten aus dem Vermehrungsanbauggebiet in Indien und waren von der LUFA Augustenberg mittels der Oosporen-Abwasch-Methode als unterschiedlich stark verseucht eingestuft: 1. Partie - MT1 (2005): Befall mit 100 Oosporen je 100 Korn, 2. Partie - MT2 (2007): Befall mit 8 Oosporen je 100 Korn, 3. Partie - MT3 (2007): Befall mit 150 Oosporen je 100 Korn. Im Ergebnis dieser Prüfung konnte *P. belbahrii* am Saatgut in sieben von zehn MT1-Proben, in acht von zehn MT2-Proben und in neun von zehn MT3-Proben nachgewiesen werden.

### 1.7 Bewertung des Saatgutes als Inokulumquelle – grow-out Test

Um die Bedeutung der Saatgutkontamination als primäre Inokulumquelle abzuschätzen, wurden mit den Saatgutpartien MT1, MT2, MT3 grow-out Tests durchgeführt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte für sechs Wochen unter optimalen krankheitsfördernden Bedingungen. In den ersten drei Tests wurden pro Partie 400 Körner (je zehn Körner pro 9-er Topf) ausgesät. Im vierten und fünften grow-out Test wurden pro Partie 100 Körner einzeln in Töpfen ausgesät und das Krankheitsauftreten bonitiert. Anschließend wurden stichprobenartig jeweils 15 Pflanzen der Partien MT3 aus dem 4. Test und je 60 Pflanzen aller drei Partien aus dem 5. Test für eine Woche in der Klimakammer kultiviert und im Abstand von zwei Tagen bonitiert.

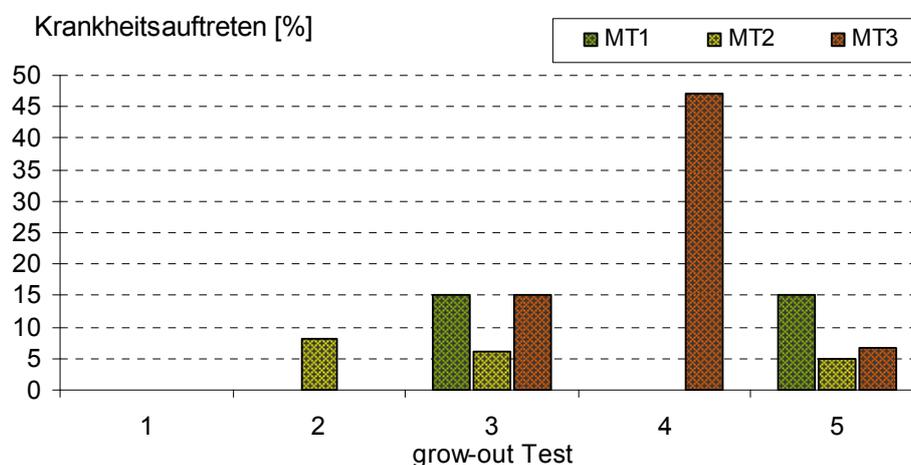


Abb. 7: Auftreten von Falschem Mehltau an Basilikumpflanzen aus den Saatgutpartien MT1, MT2 und MT3.

Im ersten Test kam es bei keiner der untersuchten Saatgutpartien zu einem Krankheitsauftreten innerhalb von sechs Wochen. Im zweiten Test wiesen vier Prozent der Pflanzen aus der Saatgutpartie MT2 einen Befall mit Falschem Mehltau auf. Im dritten Test wiesen 15 % der Pflanzen aus der MT1 Saatgutpartie, 6 % aus der MT2 und 15 % aus der MT3 Saatgutpartie Krankheitssymptome des Falschen Mehltaus auf (Abb. 7). Im 4. und 5. grow-out Test

waren die Pflanzen bis sechs Wochen nach der Keimung befallsfrei. Erst als einige Pflanzen stichprobenartig unter deutlich krankheitsfördernden Bedingungen weiter kultiviert wurden, waren vereinzelt Symptome an den Pflanzen festzustellen. So wiesen im vierten Test 47 % der Pflanzen aus der Saatgutpartie MT3 und im fünften Test 15 % der Pflanzen aus MT1, 5 % aus MT2 und 6,7 % aus MT3 Symptome des Falschen Mehltaus auf. Mit dem spezifischen Primer konnte der Erreger im Pflanzenmaterial nachgewiesen werden.

Der grow-out Test ist eine sichere Methode zum Nachweis des Erregers. Er ist jedoch kosten- und zeitintensiv (Personal, Platzbedarf, Kultivierung unter kontrollierten Bedingungen) (Abb. 8).



Abb. 8: Grow-out Test im Kabinengewächshaus. Inkubation von Pflanzen (links), kranke Basilikumpflanzen mit Symptomen vom Falschen Mehltau (rechts bei ca. 40 Körnern im Topf).

### 1.8 Resistenzprüfung von F<sub>2</sub>-Nachkommen

Um das Merkmal Resistenz aus den fünf resistenten Genotypen in eine vermarktungsfähige Sorte der Firma GHG Saaten einzukreuzen, wurden im Zuchtgarten des Kooperationspartners Kreuzungsversuche zwischen diesen Genotypen und nicht resistenten Basilikum-Genotypen des Genoveser Typs durchgeführt. Die resistenten Genotypen wurden sowohl als Mutter- als auch als Vaterpflanzen (Pollenspender) benutzt. Die Kreuzungen erwiesen sich als schwierig, da der Blühzeitpunkt der Kreuzungspartner zu verschiedenen Zeiten erfolgte. Die aus den Kreuzungen entstandenen F<sub>1</sub>-Generationen wurden vom Züchter anhand ihres intermediären Aussehens selektiert. Diese Pflanzen wurden, soweit sie fertil waren, geselbstet, um ausreichend Prüfmaterial zur Verfügung zu haben. Aus der F<sub>1</sub>-Nachkommenschaft wurden auf diese Weise 95 Pflanzen mit indermediärem Charakter selektiert und geselbstet. Da jede einzelne Pflanze eine potenzielle resistente Pflanze sein kann, wurde eine möglichst hohe Anzahl an F<sub>2</sub>-Pflanzen geprüft. Insgesamt wurden 3110 Basilikum-Pflanzen aus 25 Linien der F<sub>2</sub>-Nachkommenschaft zweimalig - im 4- und 8-Blattstadium - auf Anfälligkeit gegen den Falschen Mehltau geprüft (Abb. 9, Tab. 2). Anschließend wurden die selektierten resistenten Einzelpflanzen bis zur Samenreife weiter kultiviert (Abb. 10).

Tab. 2: Ergebnis der gegen Falschen Mehltau geprüften Basilikum-F<sub>2</sub>-Nachkommen aus Kreuzungen zwischen resistenten und anfälligen Eltern des Genoveser Types

Nr.	Kreuzung zwischen		Wuchstyp	F <sub>2</sub> -Nachkommen	
	Mutter	Vater		geprüfte Pfl.	resistente Pfl.
1	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	156	155
2	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	101	18
3	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	122	10
4	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	112	8
5	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	140	3
6	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	114	13
7	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	129	12
8	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	117	19
9	res. Genotyp	Genoveser Typ	intermediär	156	149
10	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	112	8
11	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	123	10
12	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	130	5
13	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	124	11
14	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	98	9
15	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	129	16
16	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	128	6
17	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	134	14
18	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	131	11
19	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	114	4
20	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	106	3
21	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	118	3
22	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	133	2
23	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	123	1
24	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	132	11
25	Genoveser Typ	res. Genotyp	intermediär	128	6

Der Großteil der geprüften F<sub>2</sub>-Nachkommen erwies sich als anfällig gegen den Falschen Mehltau (Tab. 2). Es konnten jedoch aus jeder Kreuzungslinie Pflanzen mit Resistenz gegenüber *P. belbahrii* mit intermediärem Charakter selektiert werden. Diese müssen durch Rückkreuzung mit den Genoveser Typen in einen vom Verbraucher akzeptierten Pflanzentyp überführt werden. Die höchste Anzahl an F<sub>2</sub>-Nachkommen mit Resistenz gegenüber *P. bel-*

*bahrii* ergaben aus den Kreuzungslinien Nr. 1 und 9, die jedoch sehr der resistenten Mutterpflanze glichen und deshalb für weitere Rückkreuzungen nicht interessant sind.



Abb. 9: Resistenzprüfung an F<sub>2</sub>-Nachkommen in der Klimakammer; anfällige Pflanzen werden gleich abgeschnitten.



Abb. 10: Als resistent selektierte F<sub>2</sub>-Nachkommen, die bis zur Samenreife kultiviert werden.

### 1.9 Charakterisierung von *P. belbahrii* Isolaten

Bei der Selektion resistenter Genotypen von Basilikum gegenüber dem Falschen Mehltau mit einer Anbaueignung muss die genetische Variabilität des Pathogens berücksichtigt werden. Die Saatgutübertragbarkeit des Erregers und die Vermehrung von Basilikum in geographisch und klimatisch unterschiedlichen Regionen (z.B. Italien und Indien) erhöht das Risiko des kontinuierlichen Eintrags genetisch diverser Isolate, die sich in ihrer Virulenz unterscheiden können. Der Aufbau einer Stammsammlung mit *Peronospora*-Isolaten aus den Vermehrungs- und Anbaugebieten und die Prüfung ihrer Virulenz sind daher notwendig.

### Vermehrung und Charakterisierung der Isolate

Die Isolate wurden aus mit *Peronospora* sp. befallenem Pflanzenmaterial und aus verseuchtem Saatgut gewonnen, über die Pflanze vermehrt und bei -20 °C gelagert (Tab. 3). Die Charakterisierung der Genotypen erfolgte mittels BOX-PCR.

Die Pathogenität von Isolaten wurde unter kontrollierten Bedingungen an der Referenzsorte ‚Bavires‘ unter den für die Resistenzprüfung beschriebenen Bedingungen geprüft.

Die Untersuchungen bzw. die BS des Referenzisolates PA06 in den einzelnen Versuchen zeigen, dass die BS deutlich von den Kulturbedingungen beeinflusst wird. Mit Ausnahme von MT1 waren alle geprüften Isolate an ‚Bavires‘ pathogen (Abb. 11). Durch die einzelnen Isolate wurden unterschiedliche BS verursacht. Am aggressivsten erwiesen sich die Isolate GM08, AG08, AT08 und Nr.1-08, die signifikant höheren BS gegenüber dem Isolat PA06 verursachten. Die Isolate GE08 und QB08, MT1 und MT2 waren signifikant weniger aggressiv im Vergleich zum Referenzisolat PA06.

Tab. 3 Isolate von *Peronospora belbahrii* aus unterschiedlichen Herkünften

Nr.	Bezeichnung	Herkunft, Jahr
1	PA06	Stammisolat ‚Bavires‘, Papenburg 2006
2	GE08	Genoveser ‚Edwina‘, Südwestdeutschland, 2008
3	GM08	Genoveser ‚Martina‘, Südwestdeutschland, 2008
4	SR08	‚San Remo‘, Südwestdeutschland, 2008
5	AG08	‚Agrian‘, Südwestdeutschland, 2008
6	AT08	‚Aton‘, hessischer Raum, 2008
7	E93-08	‚E93-3002 IW‘, hessischer Raum, 2008
8	Nr.1-08	‚Nr.1‘, hessischer Raum, 2008
9	MT1	‚Basinova‘, Aschersleben (Saatgut), 2005
10	MT2	‚Basinova‘, Aschersleben (Saatgut), 2007
11	MT3	‚Basinova‘, Aschersleben (Saatgut), 2007
12	QB08	‚Genoveser Typ‘, Quedlinburg, 2008
13	WI09	‚Genoveser Typ‘, Wien, 2009

Die Ergebnisse der BOX-PCR (Abb. 12) zeigen, dass die Mehrzahl der Isolate vergleichbare Fingerprints aufweisen und dass es sich um sehr ähnliche Genotypen handelt. Nur AG08 unterscheidet sich deutlich von den untersuchten Isolat. Von den Isolat. MT2, MT3 und AT08 konnten keine Fingerprints generiert werden.

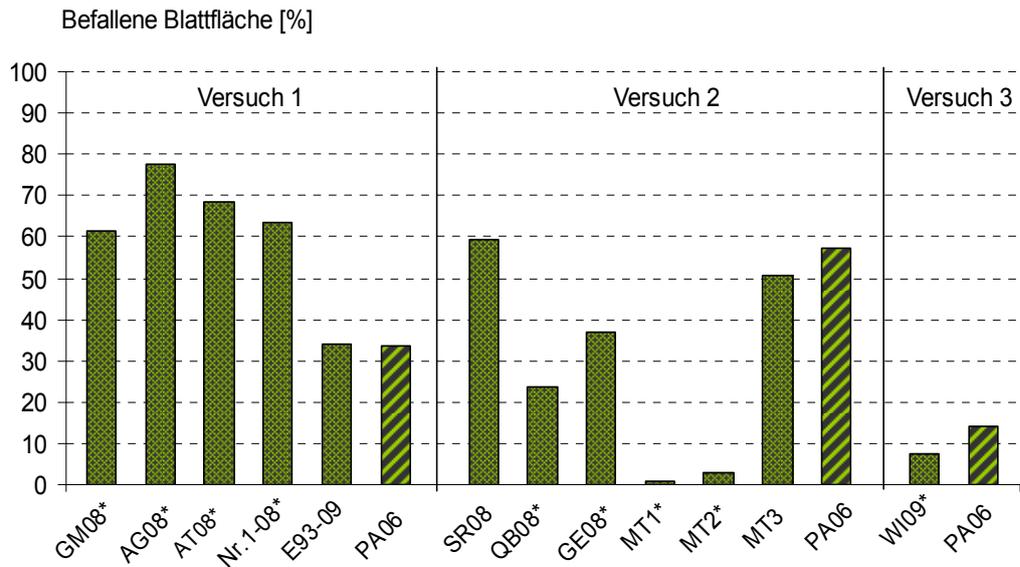


Abb. 11: Befallsstärke der *Peronospora*-Isolate GM08, AG08, AT08, Nr.1-08, E93-08, QB08, SR08, GE08, MT1, MT2, MT3, WI09 und des Referenzisolates PA06 an ‚Bavires‘. 14 Tage nach Inokulation; \* signifikant verschieden zu PA06 im jeweiligen Versuchsblock; zweiseitiger Dunnett-Test, P = 0,05.

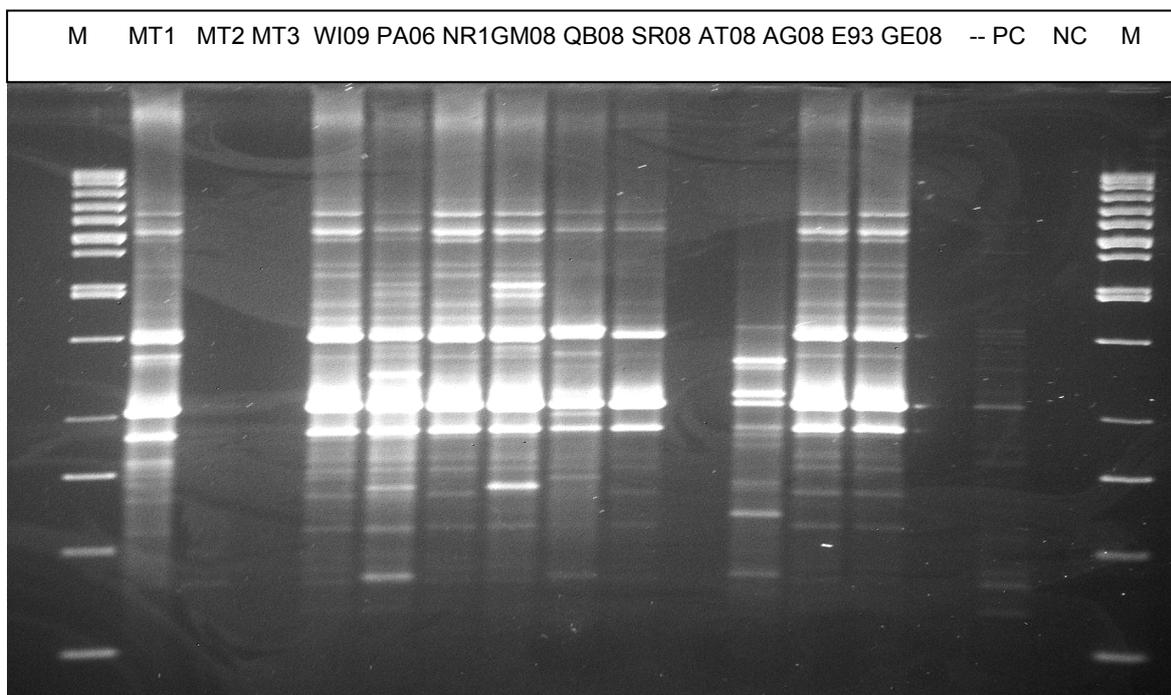


Abb. 12: BOX-PCR-Fingerprints von *P. belbahrii* Isolaten MT1, MT2, MT3, PA06, WI09, Nr1, GM08, QB08, SR08, AT08, AG08, E93 und GE08; PC: Positivkontrolle, NC: Negativkontrolle; M: Marker (1kb).

### **3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Ziel der Arbeiten war es, resistentes Pflanzenmaterial gegen *Peronospora* sp. zu selektieren, um die Resistenz im Rahmen des Zuchtprogrammes von GHG Saaten in eine marktfähige resistente Sorte einzukreuzen. Dafür war die Entwicklung einer Resistenzprüfmethode eine notwendige Voraussetzung, die wiederum Kenntnisse zur Biologie des Erregers erforderte. Prüfungen zur Pathogenität verschiedener Isolate von *Peronospora* sp. zeigten, dass die Virulenz von Umweltbedingungen beeinflusst wird, die Isolate sich jedoch in ihrer Virulenz nicht deutlich unterscheiden. Die Resistenzprüfungen wurden mit dem Isolat PA06 durchgeführt. Es konnten resistentes Pflanzenmaterial selektiert und der Züchtung bereit gestellt werden. Insgesamt waren die im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten erforderlich und in ihrem Umfang angemessen. Zusätzlich wurde eine Methode zum Nachweis des Erregers am Saatgut in das Versuchsprogramm aufgenommen, da dieses als Quelle für die Primärinfektion anzusehen ist.

### **4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Kurz- und mittelfristig werden die Erfolgsaussichten als hoch eingestuft. Da der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Kräuterproduktion mit hohen Auflagen verbunden ist, ist die Entwicklung einer oder mehrerer resistenter Basilikum-Sorten mittelfristig ein Weg zur sicheren Produktion von Basilikum. Die bislang selektierten resistenten Basilikumpflanzen sind eine gute Voraussetzung für die Entwicklung einer marktfähigen Basilikum-Sorte, die den Wünschen des Konsumenten entspricht.

Aus den Ergebnissen zur Biologie des Erregers ist zu entnehmen, dass *Peronospora* sp. sich sehr den Kulturbedingungen seiner Wirtspflanze angepasst hat und bei warmer, lichtreicher und feuchter Witterung sich gut entfalten und vermehren kann. Regelmäßige Kontrollen sowie zielgerechte Behandlung der Samenträger und Einhaltung von hygienischen Kulturmaßnahmen sind im Vermehrungsgebiet zu empfehlen. Wie die Ergebnisse der Saatgutbewertung zeigen, kann sich von kontaminiertem Saatgut eine Epidemie entwickeln. Die Vermehrungsbetriebe müssen davon ausgehen, dass das vermehrte Saatgut mit *Peronospora* sp. infiziert sein kann. Durch die schnelle und sensible PCR-Nachweismethode kann das Saatgut auf Kontamination untersucht werden.

### **5 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Sind keine bekannt.

## 6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse aus dem Forschungsvorhaben wurden auf verschiedenen Tagungen vorgestellt bzw. in diversen Fachzeitschriften veröffentlicht:

- Römer, P., Grosch, R., Kofoet, A., Djalali Farahani-Kofoet, R. 2010. Selection of basil (*Ocimum basilicum*) breeding material resistant against downy mildew (*Peronospora* sp.) and tolerant to low temperature. *Acta Horticulturae* 860, 147-152.
- Djalali Farahani-Kofoet, R., Römer, P., Kofoet, A., Grosch, R. 2010. Resistenzscreening von Basilikum-Herkünften (*Ocimum basilicum*) gegen den Erreger des Falschen Mehltaus (*Peronospora* sp.). 57. Deutsche Pflanzenschutztagung "Gesunde Pflanze - gesunder Mensch", 06.-09. September, Berlin, Deutschland, Abstractband S. 171.
- Römer, P., Grosch, E., Kofoet, A., Djalali Farahani-Kofoet, R. 2009. Development of breeding material of basil (*Ocimum basilicum*) with resistance against downy mildew (*Peronospora* sp.) and with tolerance to low temperatures. Abstract, 4th ISBMAP: Biodiversity conservation and use of genetic resources; 17-21 June 2009 Ljubljana, Slovenia. Tagungsband S. 27.
- Djalali Farahani-Kofoet, R., Römer, R., Grosch, R., Kofoet, A. 2009. Seed-transmission of *Peronospora* sp. on sweet basil – development of a rapid and specific pathogen detection method. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 19.-23. Juli, Quebec, Abstractband, S. 57-58.
- Djalali Farahani-Kofoet, R., Römer, P., Grosch, R., Kofoet, A. 2008. Biologische Grundlagen für die Entwicklung eines Resistenzscreenings von Basilikum gegen *Peronospora* sp. 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22.-25. September Kiel, Deutschland, Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut 417, 420.
- Römer, P., Kofoet, A., Djalali Farahani-Kofoet, R., Grosch, R. 2008. Entwicklung von Zuchtmaterial von Basilikum (*Ocimum basilicum*) mit Resistenz gegen Falschen Mehltau (*Peronospora* sp.) und erhöhter Kältetoleranz. ‚Innovationstage 2008‘, Veranstaltung der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn, 15.04.-16.04.2008 Tagungsband, S. 29-31.
- Römer, P., Grosch, R. 2010. Entwicklung von Zuchtmaterial von Basilikum (*Ocimum basilicum*) mit Resistenz gegen Falschen Mehltau (*Peronospora* sp.) und erhöhter Kältetoleranz. ‚Innovationstage 2010‘ der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Berlin, 06.10.-07.10.2010. Tagungsband, S. 69-71.

### III. Erfolgskontrollbericht

#### 1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

##### A) Allgemeine Ziele

1. Stärkung der Wettbewerbsfähigkeit: Durch das Aufgreifen der Problematik „Falscher Mehltau im Basilikumbestand“ stärkt der Kooperationspartner GHG Saaten bei erfolgreicher Beendigung des Zuchtziels die Wettbewerbsfähigkeit des Unternehmens.
2. Stärkung der wirtschaftlichen Innovationskraft: Innerhalb des Forschungsvorhabens wurden zahlreiche Pflanzenherkünfte aus eigener Züchtung und der Genbank hinsichtlich ihrer Resistenz gegen den Falschen Mehltau getestet. Basierend auf diesem Material konnte die Züchtung intensiviert bzw. gestärkt werden. Mit entsprechend resistenten Sorten ist in naher Zukunft zu rechnen.
3. Schaffung und Sicherung von Arbeitsplätzen: Für die Schaffung neuer Arbeitsplätze ist der Markt derzeit noch zu klein. Für die sehr zeitaufwendigen Züchtungsarbeiten bezüglich Einkreuzung der Resistenz in eigenen Zuchtstämmen, konnten die Arbeitsplätze vorhandener Mitarbeiter des KMU gesichert werden.
4. Schonung natürlicher Ressourcen: Die Schonung natürlicher Ressourcen in den Saatgutvermehrungsgebieten liegt nicht in der Hand des Züchters. Da Basilikumbau in Deutschland hauptsächlich unter Glas erfolgt, sind natürliche Ressourcen nicht direkt betroffen. Das Ziel jedoch resistente Pflanzen anzubauen würde den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln minimieren und so die Umwelt schonen. Um den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln während der Kultur zu vermeiden, empfiehlt es sich außerdem, zum einen stark kontaminiertes Saatgut aus dem Verkehr zu ziehen und zum anderen durch Saatgutdesinfektionsmaßnahmen (chemisch, physikalisch oder mit geringen Fungizidmengen) der Ausbreitung der Krankheit entgegenzuwirken. Auf diese Weise kann der Schonung natürlicher Ressourcen nachgekommen werden.
5. Verbesserung der Arbeitsbedingungen: Dieser Aspekt kann in naher Zukunft erreicht werden, wenn resistente Basilikumsorten auf den Markt angeboten werden. Dadurch kann die Aufwandmenge von Pflanzenschutzmitteln reduziert werden und damit die Arbeitsbedingungen für den Produzenten verbessern.

##### Spezifische Ziele im Rahmen der Züchtung von Kulturpflanzen

1. Mit Pflanzen neue Märkte erschließen: Mit dem Einsatz von resistenten Basilikumsorten könnte der Markt von ökologischen Produkten erweitert werden.

2. Die Qualität zu verbessern und den Anteil erwünschter Inhaltsstoffe zu erhöhen: Durch den Verzicht auf Pflanzenschutzmitteln an Kräutern verbessert sich generell die Qualität der Pflanzen.
3. Den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu reduzieren: Gegen Falschen Mehltau resistente Basilikumpflanzen würden den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln minimieren. Mit der präzisen PCR-Nachweismethode können mit *Peronospora belbahrii* stark verseuchte Saatgutchargen aufgedeckt und der Vertrieb durch den Züchter eingestellt werden, um Primärinfektionen und somit auch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu reduzieren.
4. Den Technologie- und Wissenstransfer umzusetzen: Die entwickelten Erkenntnisse können für andere Kräuter angewendet werden, um den sich stark verbreitenden Erreger des Falschen Mehltaus entgegenzuwirken.

## **2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen**

Die Resistenzprüfungen an knapp 250 Genotypen zeigten, dass vor allem dem Genoveser Typ entstammende Basilikum-Zuchtmaterial, gegen den Falschen Mehltau sehr anfällig ist.

Dennoch konnten fünf Herkünfte gefunden werden, die zwar weit entfernt vom auf dem Markt gefragten Basilikum Genoveser Typ sind, aber eine Resistenz gegen den Erreger des Falschen Mehltaus aufweisen. Diese Resistenzeigenschaften sollten an Nachkommen, die aus Kreuzungen mit Genoveser-Typen stammen, weiter vererbt werden. Die ersten Ergebnisse aus Kreuzungsversuchen sind sehr vielversprechend. Da es gilt, die optischen und geschmacklichen Eigenschaften der Genoveser Genotypen einzukreuzen, ist ein langwieriges Rückkreuzungsprogramm erforderlich.

Aufgrund der Vermehrung des Saatgutes in warmen Gebieten, wie Indien und Italien, ist es dem Basilikumzüchter nicht möglich, die Krankheitsentwicklung während der Samenproduktion zu kontrollieren. Der in letzter Zeit oft auftretende Befall in Basilikumbetrieben in Deutschland weist auf eine starke Verseuchung des Saatgutes mit *P. belbahrii* hin. Möglicherweise sind die Böden in den Saatgutvermehrungsgebieten stark mit den Dauersporen des Erregers verseucht. Daher ist generell eine Saatgutdesinfektion zu empfehlen. Derzeit gibt es jedoch keine alternativen Behandlungsstrategien zur Kontrolle von *P. belbahrii* am Saatgut, ausgenommen die konventionelle Saatgutbeizung mit Pflanzenschutzmitteln. Um den steigenden Anforderungen der Konsumenten nach ökologischer Produktion von Kräutern nachkommen zu können, wird empfohlen die verschiedenen mechanischen sowie physikalischen Methoden der Saatgutdesinfektion in Betracht zu ziehen.

Da die Licht- und Temperaturanforderungen von Basilikum sehr hoch sind und die Pflanzen bis zum Verkauf eine Anzuchtphase von ca. acht Wochen haben, besteht kaum eine Mög-

lichkeit den Befall mit Falschen Mehltau anhand von Licht- und Temperatursteuerung zu kontrollieren. Dennoch hat die Einhaltung bestimmter Kulturführungsmaßnahmen zur Vermeidung der Ausbreitung des Erregers eine große Bedeutung. Ständige Kontrollen im Bestand, Vermeidung von Kopfüber-Bewässerung sowie hygienische Maßnahmen (Desinfektion von Geräten und Hände) und regelmäßige Lüftung sind wichtige Parameter, um einer Ausbreitung des Erregers im Bestand entgegenzuwirken.

### **3. Fortschreibung des Verwertungsplans**

Siehe Schlussbericht des KMU-Partners GHG Saaten GmbH.

### **4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben**

Bis auf die Frage des Wirtspflanzenkreises und Rassenbildung konnten grundsätzlich für die zu Beginn des Forschungsvorhabens gestellten Fragestellungen Lösungen erarbeitet werden. Andererseits wurden während des Forschungsvorhabens aber auch neue Fragen aufgeworfen, wie molekulare Nachweisgrenze im Pflanzenmaterial, Bewertung der Saatgutkontamination und Einfluss der Kulturführung auf die Befallsstärke durch *Peronospora* sp.

### **5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer**

Die Ergebnisse des Vorhabens sind frei zugänglich. Weitere Informationen sowie Material für Präsentationen werden von den Projektpartnern auf Anfrage gerne zur Verfügung gestellt.

### **6. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung**

Die angestrebten Untersuchungen konnten im verfügbaren Zeit- und Kostenrahmen durchgeführt werden.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN ----	2. Berichtsart Schlussbericht
3. Titel Entwicklung von Zuchtmaterial von Basilikum ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) mit Resistenz gegen Falschen Mehltau ( <i>Peronospora</i> sp.) und erhöhter Kältetoleranz	
3. Autoren Dr. Rita Grosch <sup>1</sup> Dr. Peter Römer <sup>2</sup> Dr. Roxana Djalali Farahani-Kofoet <sup>1</sup>	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2010
	6. Veröffentlichungsdatum 31.03.2011
	7. Form der Publikation Interner Bericht
8. Durchführende Institutionen <sup>1</sup> Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Theodor Echtermeyer Weg 1, 14979 Großbeeren <sup>2</sup> GHG Saaten GmbH, Albert-Drosihn-Str. 9, 06449 Aschersleben	9. Ber. Nr. Durchführende Institution ----
	10. Förderkennzeichen 28-1-41.012-06
	11. Seitenzahl 20
12. Fördernde Institution Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 53107 Bonn	13. Literaturangaben 9
	14. Tabellen 3
	15. Abbildungen 12
16. Zusätzliche Angaben -----	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) ----	
18. Kurzfassung Seit 2001 tritt der Falsche Mehltau an Basilikum in Mitteleuropa und anderen Teilen der Welt auf und verursacht in der Schnitt- und Topfbasilikumproduktion erhebliche Ausfälle. Töpfe mit befallenen Pflanzen lassen sich nicht mehr verkaufen und bedeuten daher einen großen wirtschaftlichen Schaden für den Gärtner. Für die Produzenten von Basilikum-Frischware ist die Produktion von gesunden Pflanzen ohne den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (insbesondere Blattfungiziden) von großer Bedeutung. Aufgrund fehlender Kenntnisse zur Biologie und Epidemiologie des Erregers <i>Peronospora</i> sp. ist die Bekämpfung äußerst schwierig. Vor allem die Frage der Bedeutung der Saatgutübertragbarkeit ist nicht hinreichend geklärt. Aus den Beobachtungen in der Praxis lässt sich ableiten, dass die heute überwiegend angebauten Sorten keine Unterschiede in der Anfälligkeit gegen den	

Falschen Mehltau zeigen.

Das Ziel im vorliegenden Forschungsvorhaben (Programm zur Innovationsförderung) war in erster Linie, umfangreiches genetisches Material (Zuchtmaterial von GHG Saaten und Genbank-Herkünfte) hinsichtlich des Verhaltens gegen den Schaderreger des Falschen Mehltaus zu untersuchen, um resistente Genotypen zu selektieren. Diese wurden als Kreuzungspartner im Zuchtprogramm der GHG Saaten aufgenommen, um die Resistenz in eine Sorte einzukreuzen. Darüber hinaus wurde eine schnelle verlässliche Nachweismethode des Erregers am Saatgut entwickelt, um eine schnelle Bewertung des Saatgutes hinsichtlich einer Infektion mit *Peronospora belbahrii* vornehmen zu können. Es ist davon auszugehen, dass Primärinfektionen, die aus kontaminierten Samen hervorgehen, für die schnelle Ausbreitung des Erregers im Bestand und im gesamten Anbaubetrieb verantwortlich sind. Als eine weitere Bekämpfungsstrategie wurde der Einfluss der Kulturführung auf den Befall mit Falschem Mehltau untersucht.

Zur Bearbeitung der aufgeführten Ziele waren zunächst Untersuchungen zur Biologie des Erregers notwendig. Die daraus resultierenden Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Entwicklung einer Resistenzprüfmethode. Die Untersuchungen zeigten, dass Temperaturen um 20 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von nahezu 100 % für etwa 20 Stunden die Infektion mit *P. belbahrii* begünstigen. Die Inokulummenge hat nur zu Beginn der Krankheitsentwicklung einen Einfluss auf die Befallsstärke. Niedrigere Inokulumdichten des Erregers weisen lediglich einen etwas verzögerten Befallsverlauf auf. Die für Basilikum optimalen Kulturbedingungen sind auch ideal für die Ausbreitung des Erregers in der Pflanze und letztlich im Bestand.

Die Resistenzprüfung des genetischen Materials ergab, dass alle Herkünfte und Sorten des im Anbau dominierenden Basilikum-Typs (Genoveser Typ) hoch anfällig gegen den Erreger des Falschen Mehltaus sind. Bei der Prüfung weiterer Basilikum-Herkünften konnten jedoch fünf resistente Genotypen selektiert werden, die sich deutlich von dem vom Verbraucher gewünschten Basilikum-Typ unterscheiden (stark behaarte, kleine Blätter, kein typischer Basilikum-Geruch und Geschmack). Zur Einkreuzung von Merkmalen des Genoveser Typs in resistente Typen wurden Kreuzungen zwischen Sorten des Genoveser Typs und den resistenten Herkünften durchgeführt. In den Nachkommenschaften wiesen zahlreiche Pflanzen eindeutig intermediären Charakter auf. Diese Pflanzen wurden geselbstet und die Nachkommenschaften hinsichtlich ihrer Mehltauanfälligkeit getestet. Es konnten zahlreiche Pflanzen mit Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau mit intermediärem Charakter selektiert werden. Diese müssen durch Rückkreuzung mit den Genoveser Typen in einen vom Verbraucher akzeptierten Pflanzentyp überführt werden.

Die bisherigen Untersuchungen zur Kulturführung zeigten, dass die Kontrolle des Falschen Mehltaus an Basilikum durch Veränderung der Kulturbedingungen wie Temperatur und Lichtstärke nicht möglich ist, da geringere Temperatur- und Lichtenforderungen sich für Basilikum als ungünstig erwiesen.

Belbahri et al. (2005) konnten mittels molekularbiologischer Untersuchungen den Erreger, der lange Zeit als der Erreger des Falschen Mehltaus an Salbei (*Peronospora lamii*) eingestuft wurde, als eine neue Species (*Peronospora belbahrii*) identifizieren und seine Saatgutübertragbarkeit nachweisen (Thines et al. 2009). Am IGZ durchgeführte PCR-gestützte Prüfungen verschiedener Saatgutpartien aus Vermehrungsbetrieben, bestätigten die Kontamination von Basilikumsaatgut mit *P. belbahrii*. Grow-out Tests zeigten, dass das Saatgut für die Primärinfektion verantwortlich ist. Derzeit gibt es keine Behandlungsstrategie zur Kontrolle von *P. belbahrii* am Saatgut.

Belbahri et al. 2005, Mycological Research 109: 1276-1287.

Thines et al. 2009, Mycological Research 113: 532-540.

19. Schlagwörter

Falscher Mehltau, Resistenzprüfung, resistente Basilikum-Genotypen, Saatgutkontamination, Nachweismethoden

20. Verlag

----

21. Preis

----